

AUS DEM PHYSIOLOGISCHEN INSTITUT MÜNCHEN,
LEHRSTUHL FÜR PHYSIOLOGISCHE GENOMIK

VORSTAND: PROF. DR. RER. NAT. MAGDALENA GÖTZ

DIE MOLEKULARE ANALYSE VON MUSKELSPINDELN IN DER DMD^{MDX}- MAUS

DISSERTATION
ZUM ERWERB DES DOKTORGRADES DER MEDIZIN
AN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT, MÜNCHEN

Vorgelegt von
Sarah Maria Limbeck,
geb. Rossmanith

2021

In Betreuung von Herrn Prof. Dr. Stephan Kröger



/

*MIT GENEHMIGUNG DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN*

Berichterstatter:	Prof. Dr. Stephan Kröger
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Benedikt Schoser Prof. Dr. Florian Heinen
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	29.04.2021

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Sarah Maria Limbeck, erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Die Molekulare Analyse von Muskelspindeln in der DMD^{mdx}-Maus

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 30.04.2021

Sarah Maria Limbeck, geb. Rossmanith

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Impaired muscle spindle function in murine models of muscular dystrophy.

The Journal of Physiology 598, 1591-1609.

Gerwin, L., **Rossmanith, S.**, Haupt, C., Schultheiss, J., Brinkmeier, H., Bittner, R.E., Kröger, S., 2020.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Stephan Kröger möchte ich für die Möglichkeit der Erarbeitung des hochinteressanten Themas, sowie für die Bereitstellung der Forschungsgegenstände und die professionelle, ermutigende und ausdauernde Begleitung danken. Während des Forschungszeitraumes gewährte er mir Freiraum und Vertrauen, was mich maßgeblich zum eigenständigen Ergründen des Themenfeldes motiviert hat.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Corinna Haupt, die mir während der experimentellen Phase, die dieser Arbeit zugrunde liegt, mit ihren kreativen, wegweisenden und unterstützenden Ratschlägen zur Seite stand. Ich konnte erheblich von ihren wissenschaftlichen Erfahrungen und konstruktiven Ideen profitieren. Frau Martina Bürkle danke ich für die akribische Hilfe, die Geduld und das tatkräftige, warmherzige Entgegenkommen in den labortechnischen Anfertigungen und Durchführungen.

Mein Dank geht außerdem an alle weiteren Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Kröger, an Frau Laura Gerwin, Frau Hedwig Barbey, Herrn Gerry Handara und Herrn Michel Knörr, die mich während meiner Arbeit motivierten und mit kompetenten Ratschlägen zur Seite standen.

Ein besonderer Dank gilt dem Gremium des Förderungsprogrammes für Forschung und Lehre der LMU München ("FöFoLe"), die mich im Rahmen des Promotionsstipendiums fachlich sowie finanziell unterstützt haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir das Studium ermöglicht und mich während der Anfertigung der Doktorarbeit liebevoll und im Glauben begleitet hat.

Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	7
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1 EINLEITUNG	9
1.1 DIE SKELETTMUSKULATUR	9
1.2 DIE MUSKELSPINDEL UND DIE GOLGI-SEHNENORGANE	10
1.2.1 DER AUFBAU DER MUSKELSPINDEL	10
1.2.2 INNERVATION DER MUSKELSPINDEL	12
1.3 DER DYSTROPHIN-ASSOZIIERTE-GLYKOPROTEINKOMPLEX	15
1.3.1 DAS DYSTROPHINGEN	15
1.3.2 AUFBAU UND FUNKTION DES DYSTROPHIN-ASSOZIIERTEN-GLYKOPROTEINKOMPLEXES	16
1.3.3 DAS β -DYSTROGLYKAN	17
1.3.4 DAS UTROPHIN	18
1.4 DIE MUSKELDYSTROPHIE DUCHENNE	20
1.4.1 CHARAKTERISIERUNG DER MUSKELDYSTROPHIE VOM TYP DUCHENNE	20
1.4.2 DER PATHOMECHANISMUS DER MUSKELDYSTROPHIE DUCHENNE	21
1.4.3 KLINIK UND PHÄNOTYP DER MUSKELDYSTROPHIE DUCHENNE	21
1.4.4 DIAGNOSTIK	22
1.4.5 THERAPIE	24
1.4.6 TIERMODELLE FÜR DIE MUSKELDYSTROPHIE DUCHENNE	26
2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	30
3 MATERIALIEN	31
3.1 VERWENDETE CHEMIKALIEN	31
3.2 ANTIKÖRPER	31
3.3 HILFSMITTEL	32
3.4 VERBRAUCHSMITTEL	33
3.5 PUFFER UND LÖSUNGEN	33
3.5.1 GEWEBEPRÄPARATION FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMIE	33
3.5.2 IMMUNHISTOCHEMIE	33
3.6 PRÄPARATIONSHILFEN	34
3.7 COMPUTERPROGRAMME	34
4 METHODEN	35
4.1 TIERE	35
4.2 AUFARBEITUNG DES GEWEBES	35
4.3 IMMUNHISTOCHEMIE	36
4.4 DOKUMENTATION UND DATENANALYSE	37
4.5 AUSWERTUNG DER MIKROSKOPISCHEN AUFNAHMEN	37
4.5.1 ANALYSE DER NEUROMUSKULÄREN ENDPLATTE UND DER MUSKELSPINDEL	37
4.5.2 QUANTITATIVE ANALYSE DER ANZAHL DER UMWINDUNGEN	38
4.5.3 QUANTITATIVE ANALYSE DER ANZAHL DER MUSKELSPINDELN	39

5	<u>ERGEBNISSE</u>	40
5.1	VERTEILUNG VON DYSTROPHIN, UTROPHIN UND β -DYSTROGLYKAN IN NEUROMUSKULÄREN ENDPLATTEN	40
5.2	VERTEILUNG VON DYSTROPHIN, UTROPHIN UND β -DYSTROGLYKAN IN MUSKELSPINDELN	44
5.2.1	DIE LOKALISATION VON DYSTROPHIN IN DER MUSKELSPINDEL	44
5.2.2	DIE LOKALISATION VON β -DYSTROGLYKAN IN DER MUSKELSPINDEL	48
5.2.3	DIE LOKALISATION VON UTROPHIN IN DER MUSKELSPINDEL	52
5.3	DIE ANZAHL DER UMRUNDUNGEN DER ANNULOSPIRALEN ENDIGUNGEN	57
5.4	QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER ANZAHL VON MUSKELSPINDELN	59
6	<u>DISKUSSION</u>	62
6.1	DIE KOMPONENTEN DES DYSTROPHIN-ASSOZIIERTEN-GLYKOPROTEINKOMPLEXES IN DER MUSKELSPINDEL	65
6.2	STRUKTURELLE VERÄNDERUNGEN AN DEN ANNULOSPIRALEN ENDIGUNGEN	71
6.3	DIE ANZAHL DER MUSKELSPINDELN IN DER C57BL/6-, DER C57BL/10SNJ- UND DER DMD ^{MDX} -MAUS	73
7	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	75
8	<u>ANHANG</u>	86
8.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	86
8.2	TABELLENVERZEICHNIS	87

Zusammenfassung

Die Muskeldystrophie des Typs Duchenne (DMD) ist eine X-chromosomal vererbte, progressiv verlaufende Muskelerkrankung, die durch Mutationen im Dystrophinogen verursacht wird. Dystrophin ist ein intrazelluläres Protein, das in der Skelettmuskulatur mit anderen Komponenten des Dystrophin-assoziierten-Glykoprotein-Komplexes (DGC) eine molekulare Brücke zwischen den subsarkolemmalen Aktinfilamenten und der extrazellulären Matrix herstellt. Mutationen im Dystrophinogen führen unter anderem zu einer Unterbrechung dieser Brücke und damit zu einer mechanischen Labilität der Skelettmuskelfasern. Utrophin ist ein autosomal kodiertes Homolog von Dystrophin, dessen Expression in der DMD^{mdx}-Maus, einem Tiermodell für die DMD, in den Muskelfasern hochreguliert wird und somit den Verlust von Dystrophin funktionell kompensiert. Klinisch äußert sich die DMD durch eine progressiv verlaufende periphere Muskelschwäche und eine Degeneration des neuromuskulären Systems. Dabei kann eine zunehmende Fallneigung beobachtet werden, deren Ursache bisher ungeklärt ist.

Ziel dieser Arbeit war es, Muskelspindeln in der DMD^{mdx}-Maus molekular und strukturell zu analysieren, um eine Erklärung für die erhöhte Fallneigung bei Patienten mit DMD zu finden. Dazu wurde die genaue Lokalisation von drei Komponenten des DGCs immunhistochemisch untersucht, das Dystrophin, dessen autosomales Homolog Utrophin und das transmembranäre β -Dystroglykan. Außerdem wurden Muskelspindeln in der DMD^{mdx}-Maus strukturell durch die Bestimmung der Anzahl der Windungen der annulospiralen Endigungen und der Anzahl der Spindeln pro Muskel analysiert. Bezüglich der Struktur der Muskelspindeln und der Anzahl von Spindeln pro Muskel konnten keine Unterschiede zwischen der DMD^{mdx}-Maus und wildtyp-Mäusen festgestellt werden. Beta-Dystroglykan und Dystrophin sind in den wildtyp-Stämmen in der Zellmembran von Intrafusalfasern vorhanden, fehlen aber im Bereich der Kontaktzone zwischen den annulospiralen Endigungen und der Intrafusalfaser. Die Utrophin Verteilung in der DMD^{mdx}-Maus entspricht der von Dystrophin in wildtyp-Mäusen. Eine kompensatorische Funktion von Utrophin innerhalb der Muskelspindeln wäre möglich und würde die fehlenden strukturellen Veränderungen erklären. Da eine Kompensation des mutierten Dystrophins durch Utrophin in DMD Patienten nicht zu beobachten ist, könnte eine eingeschränkte Funktion von Muskelspindeln die erhöhte Fallneigung in den Patienten erklären.

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Azetylcholin
AChE	Azetylcholin-Esterase
AChR	Azetylcholinrezeptoren
α-BTX	alpha-Bungarotoxin
α-DG	alpha-Dystroglykan
β-DG	beta-Dystroglykan
C57Bl/6	Janvier Labs (JAX® C57Bl/6 - 000664)
C57Bl/10SnJ	Jackson Laboratory (C57Bl/10SnJ)
BMD	„Becker Muscular Dystrophy“ (Deutsch: Muskeldystrophie vom Typ Becker)
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca²⁺	Kalziumion
DAPI	4', 6'-Diamido-2-Phenylindol
DGC	Dystrophin-assoziiertes Glykoproteinkomplex
DHPR	Dihydropyridinrezeptor
dko	doppel-knockout Maus
DMD	„Duchenne Muscular Dystrophy“ (Deutsch: Muskeldystrophie vom Typ Duchenne)
DMD^{mdx}-Maus	Laboratory (C57BL/10ScSn-DMD ^{mdx} /J)
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EPP	Endplattenpotential
EDL	Extensor digitorum longus
HSC	„Haematopoietic stem cell“ (Deutsch: Hämatopoetische Stammzelle)
KAFO	„Knee-Ankle-Foot-Orthosis“ (Deutsch: Ganzbeinorthese)
L4	4. Lendenwirbelkörper
M.	„Musculus“ (Deutsch: Muskel)
mAB	„Monoclonal antibody“ (Deutsch: Monoklonaler Antikörper)
MTJ	„Myotendinous junctions“ (Deutsch: Muskel-Sehnen-Übergängen)
N.	„Nervus“ (Deutsch: Nerv)
NFH	Schwere Untereinheit von Neurofilament
NME	Neuromuskuläre Endplatte
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NT-3	Neurotrophin-3
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
RyR1	Ryanodinrezeptor-1
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
VGLUT1	Vesikulärer Glutamatttransporter-1
YFP	Yellow Fluorescent Protein

1 Einleitung

1.1 Die Skelettmuskulatur

Die Skelettmuskulatur umfasst alle Muskeln, die für willkürliche Bewegungen zuständig sind. Beim Menschen setzt sich der gesamte Skelettmuskelapparat aus mehr als 400 Muskeln zusammen und stellt somit mit etwa 40 Prozent des Gesamtkörpergewichts das größte Organ des Menschen dar (Frontera & Ochala, 2015).

Morphologisch ist der Skelettmuskel als ein komplexes Gebilde aus mehreren Unterstrukturen aufgebaut. Die kontraktilen Myofilamente Aktin und Myosin, deren kleinste funktionelle Einheit als Sarkomer bezeichnet wird, werden zu größeren Myofibrillen zusammengefasst. Mehrere Myofibrillen füllen eine Muskelfaser aus. Muskelfasern weisen im Menschen einen Durchmesser von ca. 10 µm bis 100 µm und eine Länge von maximal 30 cm auf (Wheater et al., 1987). Man unterscheidet intrafusale (latein. fusa = Spindel) von extrafusalen Muskelfasern. Muskelfasern die innerhalb spindelförmiger Rezeptoren, den sogenannten Muskelspindeln, liegen, werden als intrafusale Muskelfasern bezeichnet. Extrafusale Muskelfasern sind alle Muskelfasern außerhalb von Muskelspindeln. Mehrere einzelne Muskelfasern werden durch bindegewebige Hüllstrukturen zu immer kleineren Primär-, Sekundär- und Tertiärbündeln zusammengefasst. Der so aufgebaute Skelettmuskel wird in seiner Gesamtheit von einer Muskelfaszie umhüllt.

Funktionell ermöglicht eine Interaktion der kontraktilen Elemente eine Stabilisierung der Körperhaltung und die Ausführung von willkürlichen und unwillkürlichen sowie von koordinierten Bewegungen. Die Skelettmuskelfasern stellen zudem die Effektoren bei Fremd- und Eigenreflexen dar (Siehe Abbildung 3).

Die Kontraktion der Skelettmuskelfasern kann willkürlich, d.h. über das zentrale Nervensystem (ZNS), gesteuert werden. Aktionspotenziale werden vom Rückenmark über α -Motoaxone zur Neuromuskulären Endplatte (NME) geleitet. Dort wird durch eine überschwellige Depolarisation der Muskelfaser ein weiteres Aktionspotenzial generiert. Es löst an den tiefen Einstülpungen des Sarkolemms, den sog. Triaden, mittels einer Erhöhung der Kalziumionenkonzentration (Ca^{2+}) eine Kontraktion der Sarkomere aus. Diese

Umsetzung des elektrischen Impulses in die Kontraktion wird als elektromechanische Kopplung bezeichnet (Meriney & Dittrich, 2013; Sine, 2012).

1.2 Die Muskelspindel und die Golgi-Sehnenorgane

Die Propriozeption ist eine Sinneswahrnehmung, durch welche dem Gehirn Empfindungen für Bewegungen, Lage und Haltung des eigenen Körpers im Raum, sowie die Lage der einzelnen Körperteile zueinander vermittelt werden. Muskelspindeln sind die wesentlichen propriozeptiven Sinnesorgane, die dem zentralen Nervensystem Informationen über den Dehnungszustand der Muskulatur vermitteln (Proske & Gandevia, 2012). Neben den Muskelspindeln dienen auch die Golgi-Sehnenorgane als elementare Propriozeptoren des muskulo-skeletalen Systems. Während die Muskelspindeln das Ausmaß und die Geschwindigkeit von Längenänderungen in der Muskulatur detektieren, nehmen Golgi-Sehnenorgane Veränderungen in der Muskelspannung wahr (Granit, 1975; Moore, 1984; Maier, 1997).

1.2.1 Der Aufbau der Muskelspindel

Muskelspindeln bestehen aus spezialisierten Muskelfasern, den sogenannten Intrafusalfasern. Im Menschen besitzen sie eine Länge von 3-8 mm und in der adulten Maus sind sie 200-400 µm lang. Sie sind parallel zu den Extrafusalfasern der Skelettmuskulatur ausgerichtet und werden von einer Bindegewebskapsel umgeben (Desaki J., 2001).

Intrafusalfasern unterscheiden sich von Extrafusalfasern durch einen kleineren Durchmesser und tragen nicht zur Kontraktionskraft bei (Smith & Ovalle, 1972). Aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften, der Anordnung der Zellkerne und ihrer Morphologie können zwei Arten von Intrafusalfasern unterschieden werden: Kernkettenfasern und Kernsackfasern. Letztere können wiederum in zwei Unterformen, in die „Bag1“- und in die „Bag2“-Fasern, unterteilt werden. Die „Bag1“- und „Bag2“-Fasern unterscheiden sich in ihren funktionellen Eigenschaften und in der Ausstattung der Myosin-ATPase (Banks et al., 1977b).

Die Kernkettenfasern besitzen in Reihe angeordnete Zellkerne. Sie reagieren proportional zum Ausmaß einer Dehnung und stellen das statische

Antwortverhalten auf eine Längenänderung dar. Die Kernkettenfasern der adulten Maus haben einen Durchmesser von 10-12 μm .

Die Kernsackfasern sind mit einem Durchmesser von 20-25 μm etwa doppelt so dick wie die Kernkettenfasern und weisen eine höhere Dichte an Zellkernen in der zentralen Region auf (Banks et al., 1982). Der Akkumulation der Zellkerne im zentralen Bereich der Kernsackfasern wird eine Unterstützung der Stabilisierung der Spindelform zugeschrieben (Poppale et al., 1979). Die Kernsackfasern zeigen ein statisches und dynamisches Antwortverhalten: Die sensorischen Endigungen der „Bag1“-Fasern reagieren differential auf die Geschwindigkeit der Dehnung und stellen die dynamische Komponente der Sensoren dar. Die sensorischen Endigungen der „Bag2“-Fasern reagieren proportional zur absoluten Längenänderung und sind wie die Endigungen der Kernkettenfasern am statischen Antwortverhalten beteiligt (Ovalle & Smith, 1972). Muskelspindeln zeigen somit ein proportional-differentiales Antwortverhalten.

In der Maus enthalten mehr als 90 Prozent der Spindeln 4 ± 1 Intrafusalfasern (Lionikas et al., 2013b). Die Anzahl der Intrafusalfasern sowie das Verhältnis von Kernsack- und Kernkettenfasern in den Spindeln bleibt während der gesamten Lebenszeit konstant. Die Extrafusalfasern hingegen verändern sich mit zunehmendem Alter. Es kommt zu einer Abnahme der Anzahl an Typ-I-Muskelfasern (Sarkopenie) und der Konduktionsgeschwindigkeit der α -Motoaxone sowie einem Anstieg der Anzahl der Motorischen Einheiten (Deschenes, 2011).

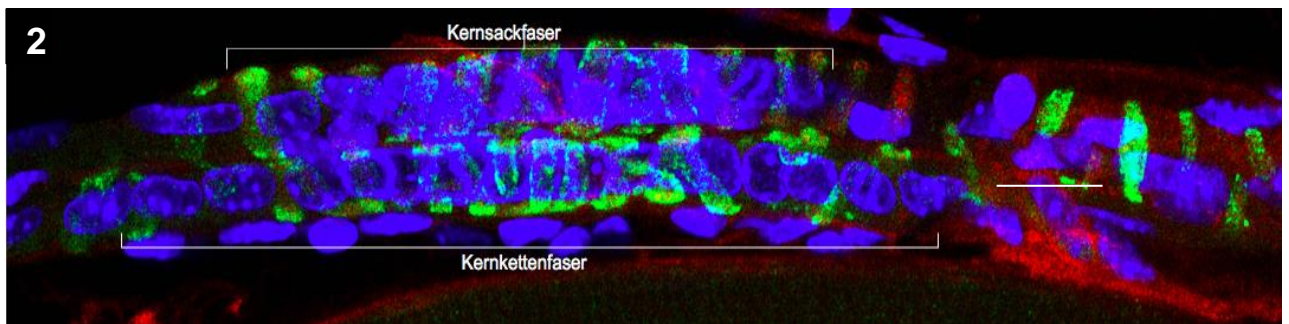
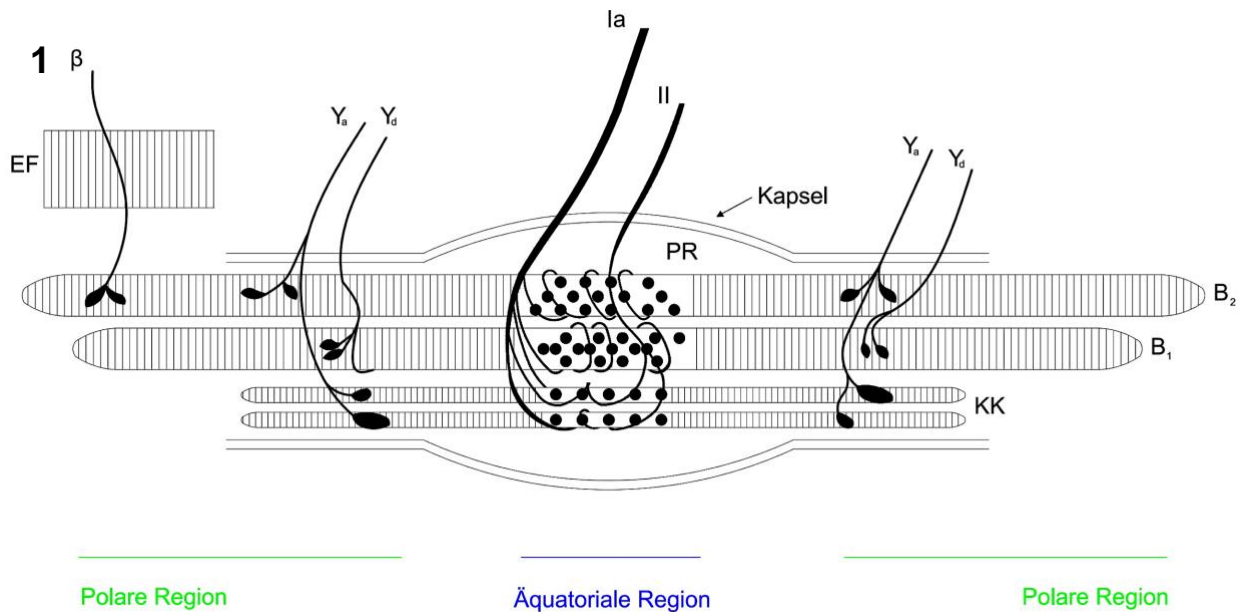


Abbildung 1: Die Struktur von Muskelspindeln. (modifiziert nach Maier, 1997 (Maier, 1997)). Muskelspindeln bestehen aus einer „Bag1“ (B1), einer „Bag2“-Faser (B2) und verschiedenen Kernkettenfasern (KK). Charakteristisch für die Spindeln ist die sowohl sensorische als auch motorische Innervation. Es existieren zwei unterschiedliche sensorische Afferenzen innerhalb der Äquatorialregion (blau): Die primären Afferenzen vom Typ-Ia und sekundären Afferenzen vom Typ-II. Die polare, kontraktile Region (grün) wird von zwei verschiedenen fusiformen Efferenzen innerviert: Die statischen γ -Motoaxone (Y_a) innervieren die „Bag1“ und die Kernkettenfasern, wohingegen die dynamischen γ -Motoaxone (Y_d) die Kernsackfasern innervieren. Jede Muskelspindel ist von einer Bindegewebskapsel umgeben (Pfeil). Der Periaxiale Raum (PR) ist mit einer Gel-ähnlichen Flüssigkeit ausgefüllt.

Abbildung 2: Confokale Aufnahme einer Muskelspindel aus einem M. soleus einer C57Bl/6-Maus. Die Zellkerne sind in DAPI (blau) dargestellt. Die Nervenfasern sind durch Anfärbung mit Antikörpern gegen VGlut1 grün dargestellt. Anhand der Kernanordnung konnte eine Kernkettenfaser und eine Kernsackfaser identifiziert werden. (Maßstab: 10 μ m)

1.2.2 Innervation der Muskelspindel

Muskelspindeln weisen eine komplexe Innervation auf. Die afferente Innervation der Muskelspindeln erfolgt durch zwei verschiedene sensible Nervenfasern, einer Typ-Ia-Afferenz und mehreren kleineren Typ-II-Afferenzen. Die Typ-Ia-Fasern sind großkalibrig, myelinisiert und besitzen eine Leitungsgeschwindigkeit von bis zu 120 m/s (bei Katzen). Sie enden annulospiralig um die zentrale, nicht kontraktile Region der Intrafusalfaser (Ruffini, 1898; Schroder et al., 1989). Die Typ-Ia-Fasern sind sensitiv für die

Muskellänge und die Geschwindigkeit der Längenänderung und zeigen ein statisches und dynamisches Antwortverhalten. Die Typ-II-Afferenzen hingegen weisen einen geringeren Durchmesser sowie eine niedrigere Leitungsgeschwindigkeit auf. Die meisten Typ-II-Afferenzen enden „blütendoldenartig“ an den Kernkettenfasern (Abbildung 1) und sind sensitiv für Veränderungen der Länge der Muskelfasern.

Als Besonderheit unter den peripheren Sinnesrezeptoren empfangen die Muskelspindeln efferente Impulse aus dem ZNS über sogenannte γ -Motoneurone, deren Somata im Vorderhorn des Rückenmarks liegen. Sie treten zusammen mit den afferenten Fasern durch die Bindegewebskapsel der Muskelspindel und bilden an den polaren Abschnitten der Intrafusalfasern sogenannte γ -Endplatten. Durch diese afferente Innervation kann die Empfindlichkeit der propriozeptiven Afferenzen kontinuierlich reguliert werden: Über die Kontraktion der polaren Region wird eine Dehnung in den zentralen Anteilen der Intrafusalfasern bewirkt. Diese Dehnung stellt einen adäquaten Reiz für die Typ-Ia und Typ-II-Afferenzen dar. Im Zuge des monosynaptischen Muskeldehnungsreflexes wird das Aktionspotential der Typ-Ia und Typ-II-Afferenzen in das Vorderhorn des Rückenmarks geleitet und auf α -Motoneurone übertragen. Es kommt zur Kontraktion der Extrafusalfasern des homonymen Muskels, sowie zur Relaxation des entsprechenden Antagonisten. Die γ -Motoneurone können die Sensibilität der propriozeptiven Afferenzen an den Kontraktionszustand der Muskelfasern anpassen (Banks, 1994).

Die komplexe Innervation der Muskelspindel ermöglicht zudem die Auslösung eines Muskeleigenreflexes. Muskelspindeln stellen die sensorische Komponente des monosynaptischen Muskeldehnungsreflexes dar. Durch eine Muskeldehnung werden die Typ-Ia-Afferenzen aktiviert. Diese erzeugen Aktionspotentiale, deren Frequenz proportional zum Ausmaß und zur Geschwindigkeit der Dehnung ist und die über den Spinalnerv in das Hinterhorn des Rückenmarks geleitet werden. Eine monosynaptische Verknüpfung zu dem im Vorderhorn gelegenen α -Motoneuron erzeugt eine Kontraktion der Skelettmuskelfasern im zuvor gedehnten Muskel. Innerhalb des monosynaptischen Streckreflexes wird über eine Kollaterale ein inhibitorisches Interneuron erregt, welches wiederum zur Relaxation des antagonistischen Muskels führt. Die Muskelspindel als Sensor und die angesteuerte

Extrafusalmuskulatur als Effektor liegen im gleichen Organ und bestimmen somit den Muskeigenreflex (Mears & Frank, 1997).

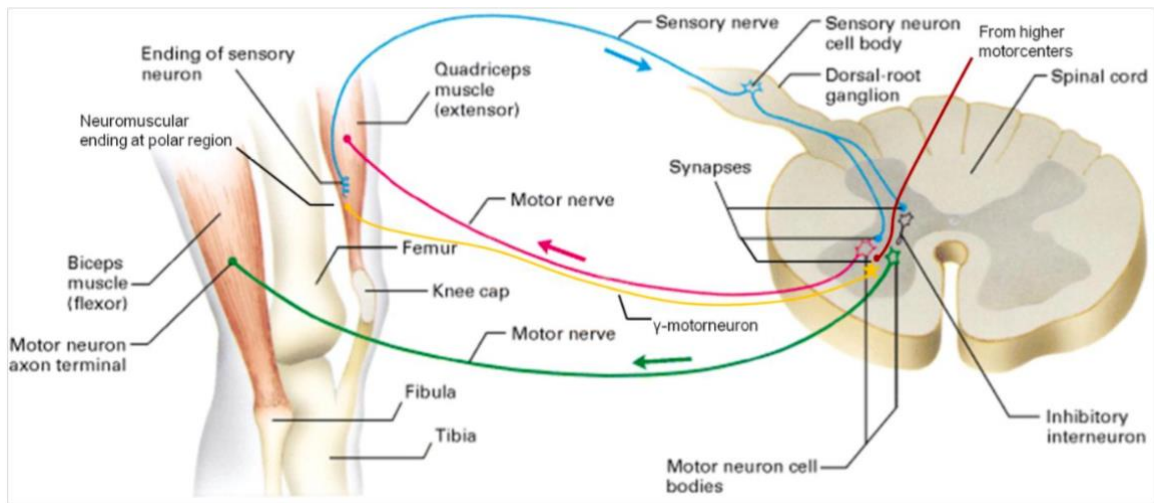


Abbildung 3: Reflexbogen des monosynaptischen Patellarsehnenreflexes. Mit Erlaubnis des Verlages (Lodish et al., 2000). Durch eine Kontraktion im M. quadrizeps wird das Bein gestreckt. Der antagonistische M. biceps femoris wird gedehnt. Der Schlag auf die Patellarsehne unterhalb der Kniescheibe führt zu einer Dehnung des M. quadrizeps und den darin lokalisierten Muskelspindeln. Die sensiblen bipolaren Neurone (blau) werden erregt. Sie werden im Hinterstrangganglion umgeschaltet. Das sekundäre Axon verläuft weiter zu den Lendensegmenten im Rückenmark und wird auf zwei Synapsen verschaltet: (1) mit einem α -Motoneuron (pink) welches den M. quadrizeps innerviert und zur Kontraktion führt, (2) mit einem inhibitorischen Interneuron, dem Renshaw-Neuron (schwarz) welches über ein motorisches Neuron den antagonistischen Muskel innerviert. Durch die Kontraktion des M. biceps femoris wird ein überschießendes Ausmaß des Reflexbogens verhindert. Durch Stimulation der sensorischen Afferenzen in den Muskelspindeln wird eine Kontraktion des M. quadrizeps ausgelöst die der passiven Dehnung entgegenwirkt und eine Konstanthaltung der Muskellänge gewährleistet. Über höhere motorische Zentren wird die Sensitivität der Muskelspindeln gegenüber Dehnungen reguliert. Dies erfolgt durch die Aktivierung von γ -Motoneuronen (gelb).

1.3 Der Dystrophin-assoziierte-Glykoproteinkomplex

Für den Kontraktionsablauf in der Skelettmuskulatur ist ein ausgeprägtes Zyto- und Membranskelett unabdingbar. Diese sorgen für die Stabilität und Integrität der Muskelfasermembran während Bewegungsabläufen. Besonderes Augenmerk wird in der vorliegenden Arbeit auf Dystrophin und den mit ihm verbundenen Dystrophin-assoziierten-Glykoproteinkomplex (DGC) gelegt. Im Folgenden wird dieser Komplex genauer erklärt.

1.3.1 Das Dystrophingen

Das Dystrophingen (*DMD*) ist das größte Gen im menschlichen Genom (Abbildung 4). Es besitzt eine Länge von circa 2,4 Megabasen und ist auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms (Position Xp21.2-p21) lokalisiert (Monaco et al., 1986). Aus dem *DMD* Gen werden durch drei gewebespezifische Promotoren drei unterschiedliche Formen von Dystrophin exprimiert: das Dp427 im Gehirn (B), im Muskel (M) und in den Purkinje Neuronen (P). Zusätzlich regulieren vier interne Promotoren die Expression von verkürzten Dystrophinisoformen, das Dp260, das Dp140, das Dp116 und das Dp71 (Blake & Kröger, 2000).

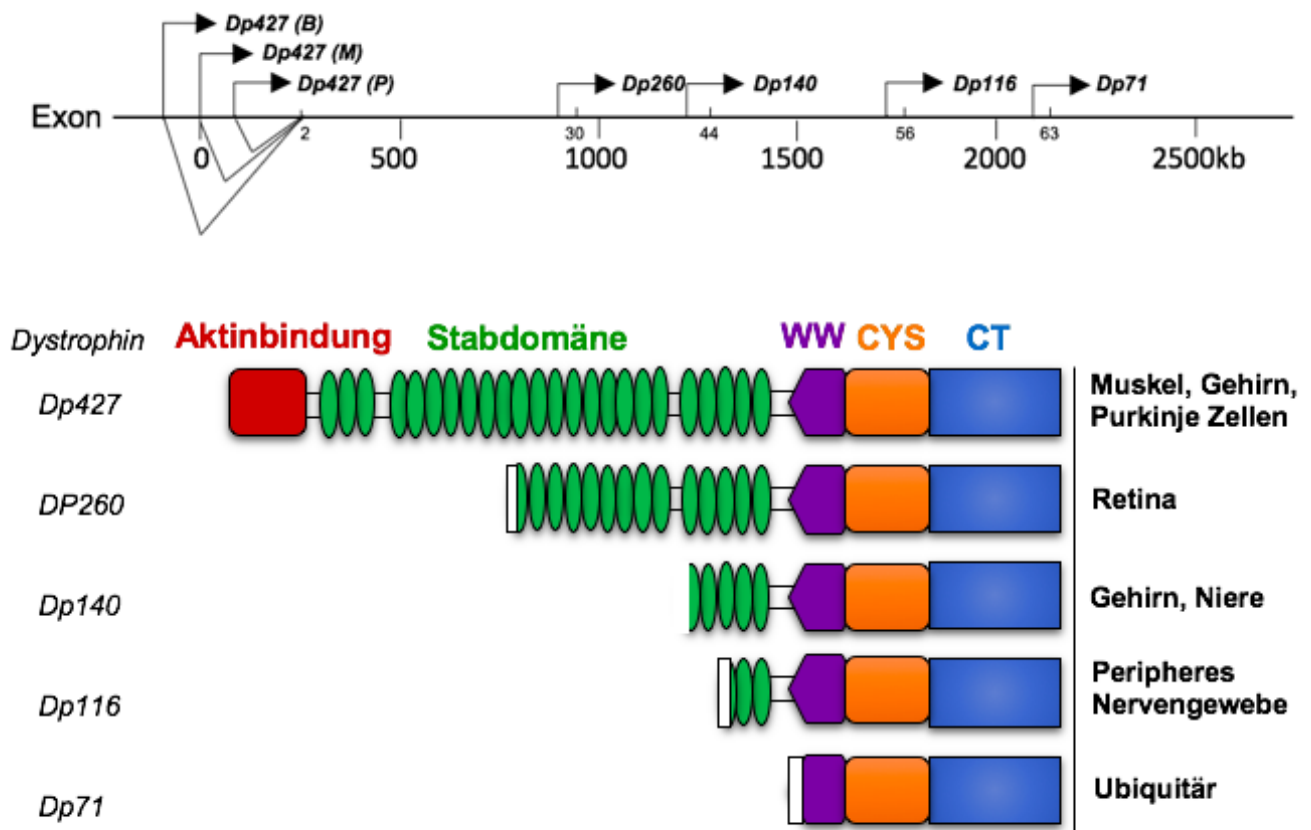


Abbildung 4: Dystrophin und seine Isoformen (Modifiziert nach Blake & Kröger, 2000). Die Expression eines gesamten Dystrophins wird durch drei Promotoren gesteuert: (B) für Brain, (M) für Muskel, (P) für Purkinje Neurone. Weitere interne Promotoren regulieren die Produktion von verkürzten Dystrophinprodukten, wie dem Dp260, dem Dp240, dem Dp116 und das Dp71. Insgesamt machen 24 helikale-Regionen und vier Scharnierregionen, dargestellt als H1-4, die zentrale Rod-Domäne aus. Bindungsdomänen für Bestandteile des DGCs im Dystrophin sind unter anderem die ZZ-Domäne (ZZ), die WW-Domäne (WW), eine „coiled-coil“ Domäne am COOH-Terminus (CT) und die cysteinreiche Region

1.3.2 Aufbau und Funktion des Dystrophin-assoziierten-Glykoproteinkomplexes

Im gesunden Muskel bildet das Dystrophin, gemeinsam mit anderen Proteinen des DGCs, an der intrazellulären Seite des Sarkolemmms einen großen Proteinkomplex (Abbildung 5). Mit seiner N-terminalen Domäne bindet Dystrophin an F-Aktin, einem Bestandteil des subsarkolemmalen Zytoskeletts. Die C-Terminale Domäne ist mit dem membranständigen β -Dystroglykan (β -DG in Abbildung 5) verbunden. Das extrazelluläre α -Dystroglykan (α -DG in Abbildung 5) ist wiederum über Laminin-2 und Agrin mit der extrazellulären Matrix verbunden. Dadurch wird eine Brücke zwischen dem subsarkolemmalen

Zytoskelett und der extrazellulären Matrix erzeugt (Allikian & McNally, 2007). Neben dem Dystroglykan und dem Dystrophin sind noch zahlreiche andere Komponenten des Membrankomplexes bekannt. Dazu gehören die Sarkoglykane, das α - und das β -Dystrobrevin, die Syntrophine sowie das Sarcospan. In der Abbildung 5 werden zur vereinfachten Übersicht nur die Sarkoglykane $\gamma, \delta, \alpha, \beta$ und Sarcospan dargestellt. Diese Proteine bilden in ihrer Gesamtheit den DGC, der als ein wichtiger Bestandteil der Membranintegrität für eine Übertragung von mechanischen Kräften auf die extrazelluläre Matrix sorgt. Zusätzlich fungiert der DGC als Gerüst für verschiedene Signaltransduktionsmoleküle, wie zum Beispiel Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS), Calmodulin und Phosphoinositol Triphosphatase 2 (Ervasti & Campbell, 1991).

In dieser Arbeit wird neben der Expression von Dystrophin zwei weitere Proteine des DGCs untersucht: Utrophin, das autosomale Homolog von Dystrophin und das transmembranäre β -Dystroglykan. Beide Proteine werden in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben.

1.3.3 Das β -Dystroglykan

Das Dystroglykan-1 Gen (*DAG1*) kodiert für Dystroglykan, welches die zentrale Komponente des DGCs darstellt. Aus dem Vorläuferprotein Dystroglykan wird durch O- und N-Glykosylierungen sowie posttranslationale proteolytische Prozessierung das hochglykosylierte α -Dystroglykan und das gering glykosylierte Transmembranprotein, β -Dystroglykan (β -DG, Abbildung 5) generiert (Barresi & Campbell, 2006; Hemler, 1999). Das α -Dystroglykan (α -DG, in Abbildung 5) bindet über seine Zuckerseitenketten an extrazelluläre Matrixproteine wie Laminin und Agrin. Die kurze, intrazelluläre Domäne von β -DG interagiert im DGC mit Dystrophin oder Utrophin (Ervasti & Campbell, 1993; S.H. Gee et al., 1993; Suzuki et al., 1992).

Die posttranslationale Veränderung von α -DG ist für die Funktion des Proteins essentiell. Dies äußert sich durch Mutationen in Glykosyltransferasen, welche zu einer Hypoglykosylierung von α -DG führt (Hara et al., 2011). Diese Hypoglykosylierungen werden bei Patienten mit Walker-Warburg Syndrom, der Muskel-Augen-Gehirn Krankheit („muscle-eye-brain disease“), der kongenitalen Muskeldystrophie vom Typ Fukuyama1C und 1D sowie der Gliedergürteldystrophie beobachtet (Barresi & Campbell, 2006). Insgesamt

konnten bisher sechs verschiedene Gene für Glykosylierungen von Dystroglykan verantwortlich gemacht werden, dazu gehören POMT1, POMT2, POMGNT1, FKTN, FKR1 und LARGE (Godfrey et al., 2007).

1.3.4 Das Utrophin

Utrophin ist ein autosomal kodiertes Homolog von Dystrophin, dessen Name sich von „ubiquitous dystrophin“ (deutsch für: „ubiquitäres Dystrophin“) ableitet. Das Protein selbst besteht aus 3433 Aminosäuren und stimmt mit Dystrophin in seiner Aminosäuresequenz zu über 80 Prozent überein. Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen den Proteinen werden vor allem im Aktin-bindenden N-Terminus, der „coiled-coil“ Region sowie dem mit Dystroglykan interagierenden C-Terminus vorgefunden (Tinsley et al., 1992). Utrophin ist ubiquitär exprimiert, d.h. in allen Geweben nachweisbar. Es befindet sich vor allem an intramuskulären Nerven, in Blutgefäßen, an Neuromuskulären Endplatten, sowie am Sarkolemm in fetalen und regenerierenden Muskeln (Augier et al., 1992; Fois, Medioni & Le Bourg, 1991). Die hohe perinatale Expression sinkt nach der Geburt. In der adulten Muskulatur wird Utrophin durch Dystrophin am Sarkolemm ersetzt (Schofield et al., 1993).

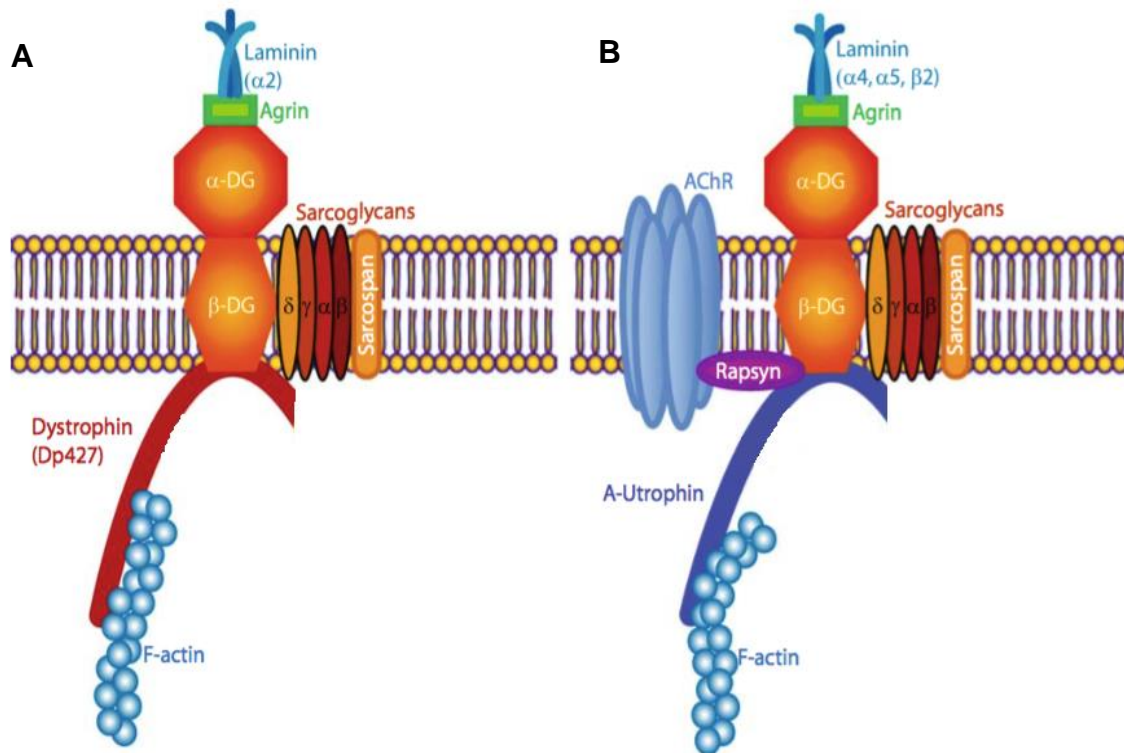


Abbildung 5: Zusammensetzung des DGCs am Sarkolemm der Skelettmuskulatur und in der NME. (Pilgram et al., 2010) Mit Erlaubnis des Verlages

A: Im Skelettmuskel ist die N-terminale Domäne von Dystrophin an F-Aktin gebunden. Das C-Terminale Ende von Dystrophin stellt eine Verbindung mit β -Dystroglykan (β -DG) her. Das transmembranäre β -DG tritt in Verbindung mit dem extrazellulär gelegenen hochglykosilierten α -Dystroglykan (α -DG). Über Agrin ist das α -DG an Laminin gebunden und stellt eine Verknüpfung zur Basalmembran her. Beta-DG assoziiert zusätzlich mit δ -Sarcoglykan, welches über den Sarcoglykan-Sarcospan-Komplex am Sarkolemm verankert ist.

B: In der Neuromuskulären Endplatte kann das Dystrophin durch das Utrophin ersetzt werden und den sogenannten Utrophin-assozierten-Glykoprotein-Komplex formen. A-Utrophin ist mit dem membranständigen β -DG verbunden. Beta-DG steht in Verbindung mit Rapsyn, welches für die Stabilisierung der Acetylcholinrezeptoren (AChR) in den postsynaptischen Einfaltungen entscheidend ist (Banks et al., 2003).

1.4 Die Muskeldystrophie Duchenne

Muskeldystrophien sind eine sehr heterogene Gruppe von mehr als 40 genetisch determinierten Erkrankungen. Sie zeichnen sich alle durch eine progressive periphere Muskelschwäche und eine Degeneration des muskuloskeletalen Systems aus (Mercuri & Muntoni, 2013). Fast alle Muskeldystrophien werden durch Mutationen ausgelöst, die direkt oder indirekt den DGC betreffen. Bei der häufigsten, der X-chromosomal vererbten Muskeldystrophie Typ Duchenne, ist das Dystrophinogen mutiert (Waite, et al., 2009). Neben der Muskeldystrophie Duchenne sind zahlreiche weitere neuromuskuläre Erkrankungen bekannt, die aufgrund einer veränderten Muskelspindelstruktur zu beeinträchtigten Bewegungskoordinationen bei Patienten führen (Zusammenstellung siehe Kröger, 2018). In dieser Arbeit soll die Struktur der Muskelspindeln in dem murinen Modell der Muskeldystrophie Duchenne untersucht werden welche im Folgenden vorgestellt wird.

1.4.1 Charakterisierung der Muskeldystrophie vom Typ Duchenne

Die Muskeldystrophie Duchenne wurde erstmals von dem französischen Neurologen, G.B.A. Duchenne im Jahre 1868 beschrieben. Neben der Muskeldystrophie fiel unter anderem die mentale Retardierung der Patienten auf. Hoffmann et al. konnten 1987 das Fehlen von Dystrophin als Ursache für DMD nachweisen (Hoffman et al., 1987). Ein chromosomaler Defekt, der zu Schäden im Dystrophin-Gen führt, wird in 60 Prozent durch Deletionen, in 30 Prozent durch Punktmutationen und in 10 Prozent durch Duplikationen verursacht. In über 98 Prozent dieser Fälle wurden die Mutationen durch vollständige oder partielle Leserasterverschiebungen verursacht und resultieren in einem kompletten Fehlen des Dystrophins (Nawrotzki et al., 1996). Mit einer Inzidenz von 1 unter 3600 männlichen Neugeborenen (Chung et al., 2016) ist die Muskeldystrophie Duchenne die häufigste Form aller Muskeldystrophien (Hoffman et al., 1987). Frauen sind Konduktorinnen und in den meisten Fällen symptomlos.

Die Becker Muskeldystrophie (BMD) stellt eine mildere Verlaufsform der Muskeldystrophie dar. Durch Genmutationen ohne Leserasterverschiebungen wird ein vermindertes funktionstüchtiges Dystrophin gebildet (Scheuerbrandt, 1998). Die klinische Symptomatik kommt bei Patienten mit BMD erst in späteren Lebensphasen zur Ausprägung. Betroffene Patienten haben eine fast normale Lebenserwartung (Englund et al., 1990).

1.4.2 Der Pathomechanismus der Muskeldystrophie Duchenne

Mutationen in Genen, die für DGC-Komponenten kodieren, führen zu einem Verlust der Expression oder der Funktion der Komponenten und resultieren in einer veränderten Funktion des Dystrophin-assoziierten-Glykoprotein-Komplexes in der Skelettmuskulatur. Muskelfasern mit mutiertem DGC sind labil und können mechanische Belastungen, die während einer Kontraktion entstehen, nicht genügend ausgleichen. Durch Muskelkontraktionen werden sie deshalb geschädigt. Dies führt unter anderem zu einem pathologisch erhöhten Kalziumeinstrom, welcher eine Degeneration der Skelettmuskelfasern bewirkt (Mercuri & Muntoni, 2013; Waite et al., 2012). Untergegangene Muskelfasern werden bei DMD Patienten teilweise durch Binde- und Fettgewebe ersetzt (Rahimov & Kunkel, 2013; Wallace & McNally, 2009). Bei gesunden Personen können degenerierende Muskelfasern durch Proliferation von Satellitenzellen regeneriert werden. Die fehlende Expression von Dystrophin in der Muskulatur führt jedoch zu einer starken Dysfunktion der Satellitenzellen: Die Entwicklung der Zellpolarität, die Elimination von asymmetrischen Satellitenzellen, sowie die myogene Proliferation sind in der DMD beeinträchtigt (Chang et al., 2016). Diese ausgeschöpfte regenerative Kapazität der Satellitenzellen sowie chronische Entzündungsprozesse führen im Laufe mehrerer Jahrzehnte zu einem progressiven Verlust an Muskelmasse und an Kontraktionskraft und bilden die Grundlage für den klinischen Phänotyp der Muskeldystrophien.

1.4.3 Klinik und Phänotyp der Muskeldystrophie Duchenne

Klinisch äußert sich die Muskeldystrophie Duchenne bereits im Kleinkindalter von 3 bis 5 Jahren mit Paresen und Atrophien der Becken- und Oberschenkelmuskulatur, die dann auf weitere Regionen übergreifen. Zudem kommt es zu einer sich vorwiegend von proximal nach distal ausbreitender Abschwächung der Reflexe (Yiu & Kornberg, 2015). Die betroffenen Kinder zeigen Schwierigkeiten beim Treppensteigen, Gangabnormalitäten und eine erhöhte Fallneigung (Dubowitz, 2000). Diagnostisch relevant ist das nach W. R. Gowers benannte „Gowers Zeichen“. Beim Aufrichten aus der Bauchlage klettern die Betroffenen aus dem Vierfüßlerstand mit den Händen entlang der Beine aufwärts und stützen sich dabei auf den Schenkeln nach oben ab (Clarke & Gowers, 1874; Abbildung 5). Das progressive Voranschreiten der Erkrankung

lässt die Patienten schon mit etwa 12 Jahren rollstuhlabhängig werden (Emery, 2002).

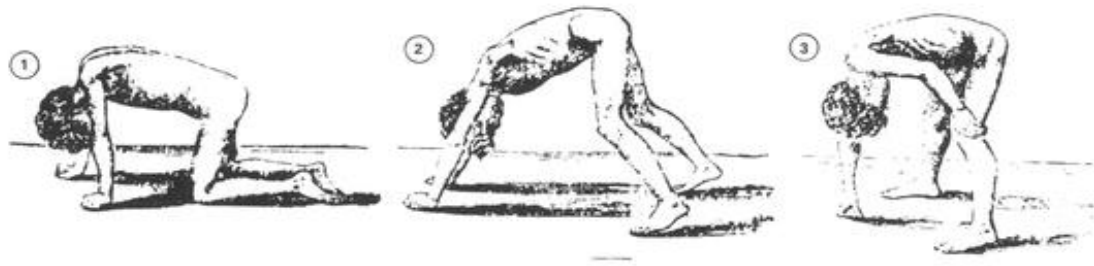


Abbildung 6: Das Gowers-Zeichen. Grafische Darstellung aus der Originalpublikation von Gowers (Clarke & Gowers, 1874).

Neben dem charakteristischen Gowers-Zeichen und der proximalen, beinbetonten Myopathie sind eine Pseudohypertrophie der Waden, Gelenkkontrakturen und Skoliose weitere klinische Kennzeichen (McDonald et al., 1995). Mit etwa 18 Jahren greift die Erkrankung häufig auf das kardiale und respiratorische Muskelsystem über. Dies kann sich in einer dilatativen Kardiomyopathie, in Herzrhythmusstörungen und in respiratorischen Insuffizienzen äußern. Die Patienten mit DMD versterben häufig in der dritten oder vierten Lebensdekade an den respiratorischen Beeinträchtigungen (Emery, 2002).

1.4.4 Diagnostik

Zur klinischen Diagnostik der DMD ist nach neurologischen, anamnestischen und klinischen Untersuchungen die Bestimmung der Creatinkinase (CK) im Blut von Bedeutung. Die CK ist ein Enzym, welches in der Muskulatur Creatinphosphat als kurzfristige Energiereserve bereitstellt. Durch den massiven Muskeluntergang ist die Gesamt-CK bereits ab der Geburt im Serum bei fast allen Betroffenen und sogar bei 70 Prozent der Konduktorinnen erhöht (Okinaka et al., 1961). Der Referenzwert der Serum-CK bei Gesunden liegt unter 150 U/L. Bei DMD Patienten können Werte weit über 1000 U/L festgestellt werden (Zatz et al., 1991). Zudem ermöglicht eine molekulare, gentechnische Diagnostik, genannt „multiplex ligation-dependent probe amplification“ (kurz: MLPA), die Erfassung von über 98 Prozent der Deletionen und Duplikationen (Abbs et al., 2010; Gatta et al., 2005). Diese Diagnostik wird zur Risikoermittlung bei Angehörigen und zur Differentialdiagnostik bei betroffenen Patienten angewendet. Zudem spielt die MLPA in der

Pränataldiagnostik bei Frauen mit hohem Überträgerinnen-Risiko eine Rolle (Murugan et al., 2010).

Über eine Muskelbiopsie lässt sich im histologischen Schnitt bei DMD Patienten das Fehlen von Dystrophin nachweisen (Abbildung 7). Neben der verminderten Dystrophinexpression gehören zu den wegweisenden histologischen Befunden, eine verstärkte Faserkalibervariation, früh auftretende endo- und perimysiale fibrotische Umbauvorgänge, zentralisierte Zellkerne und das Vorhandensein von regenerierenden und degenerativen Muskelfasern. Einzelne Muskelfasern, die als „revertant fibers“ bezeichnet werden können dennoch eine Färbung von Dystrophin zeigen: Diese Muskelfasern entstehen vermutlich durch einen Mechanismus, der durch das Ersetzen einzelner Exons zu einem korrekten Leseraster führt. Durch diese alternativen Spleißvorgänge wird in einzelnen Muskelfasern das Vorhandensein von Dystrophin ermöglicht. (Morrison et al., 2000; Nicholson et al., 1990).

Die Diagnostik über eine invasive Muskelbiopsie wird heute aufgrund der fortschrittlichen, molekularen Untersuchungsmöglichkeiten nur noch selten angewandt.

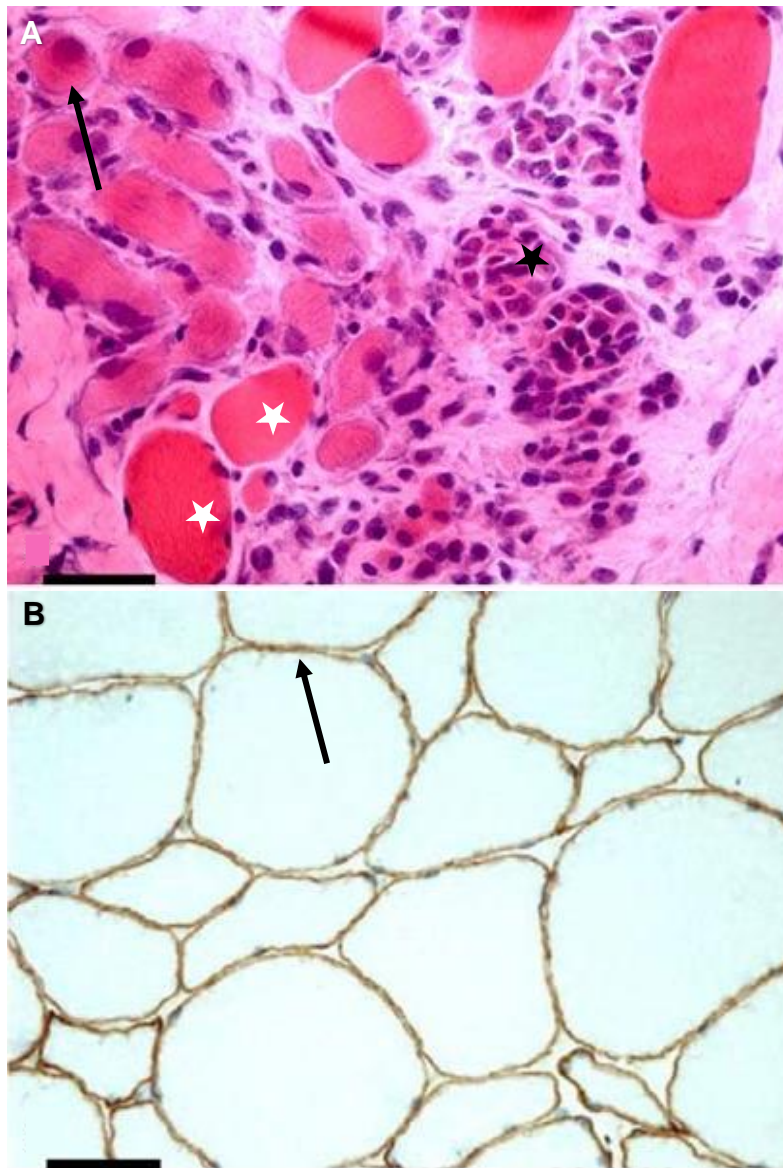


Abbildung 7: Muskelhistologie und Immunhistochemie der Muskeldystrophie Duchenne im Menschen: (Abbildung modifiziert nach Neuen-Jacob, 2009, Mit Erlaubnis des Verlages
a) Muskelhistologie: zeigt die Histologie mit bereits fortgeschrittenem fibrotischem Umbau der Muskelfasern (Stern in schwarz). Es lassen sich nekrotische und basophile Muskelfasern erkennen sowie pathologische Kernzentralisationen (Pfeil). Die Muskelfaserquerschnitte zeigen Kaliberschwankungen (Sterne in weiß). **b) Immunhistochemie:** Muskelfaserquerschnitt mit membranständiger Lokalisation von Dystrophin (Pfeil); Maßbalken in **a** 60µm in **b** 40µm

1.4.5 Therapie

Bis heute kann die Muskeldystrophie Duchenne nicht kausal behandelt werden. Multidisziplinäre Maßnahmen stehen derzeit im Vordergrund, um eine symptomatische Verbesserung der Muskeldystrophie Duchenne zu erreichen: Dazu gehört die Langzeittherapie mit Kortikosteroiden, wie Prednison und Deflazacort durch welche ein verzögerter Kraftverlust bei DMD Patienten beobachtet wird (Simonds, 2006). Mit dem Einsatz von Kreatinmonohydrat und

Beta-2-Sympathomimetika kann eine Krafterhöhung in der DMD und der BMD erreicht werden (Davidson & Truby, 2009). Um einer drohenden Kardiomyopathie entgegen zu wirken, können ACE-Hemmer (z.B. Perindopril) und Beta-Blocker eingesetzt werden.

Physiotherapeutische Maßnahmen und Orthesen, die sich gegen die Entwicklung von Gelenkkontrakturen und Skoliose richten, können den fortschreitenden, eingeschränkten Bewegungsgrad der Patienten eindämmen (McDonald et al., 1995). Der respiratorischen Verschlechterung in Form einer hyperkapnischen Insuffizienz kann eine Behandlung mittels einer assistierten, nicht-invasiven Heimbeatmung entgegenwirken (Soudon et al., 2008).

Neben der symptomatischen Therapie erschließen sich durch neue molekulare Technologien weitere therapeutische Möglichkeiten. So können einzelne Proteine hochreguliert werden, um den Muskelschwund zu verhindern (Gilbert et al., 1999). Myogene Stammzellen werden eingesetzt, um degenerierte Muskelfasern wiederherzustellen (Lin et al., 2013).

Zusätzlich können Nonsensemutationen mit einem prämaturnen Stop-Codon korrigiert werden, indem ein „Readthrough“ mit Aminoglykosid-Antibiotika eingesetzt werden (Bushby et al., 2014). Mittels Antisense-Oligonukleotide kann ein „Exon Skipping“ induziert werden und dadurch in den Krankheitsprozess eingegriffen werden (Kinali et al., 2009). Weiterhin liefern virale Vektoren die Möglichkeit durch einen Gentransfer das fehlende Dystrophin in den Muskeln wiederherzustellen (Calcedo & Wilson, 2013).

Diese zahlreichen Therapieansätze im Bereich der Stammzell- und Gentherapie haben bislang in Tiermodellen erfolgreiche Resultate gezeigt. Ihre Anwendung an Patienten wird jedoch noch viele Jahre Forschung benötigen.

Ein Therapieansatz, der im Zusammenhang mit dieser Arbeit besonders hervorzuheben ist, ist die Hochregulierung von Utrophin. Utrophin ist ein Homolog von Dystrophin, dass in der Mausmuskulatur das fehlende Dystrophin funktionell kompensieren kann (Khurana et al., 1991). Mithilfe von Adeno-assoziierten, viralen Vektoren soll das Utrophin gentherapeutisch in den Muskel eingebracht werden. Es handelt sich dabei um einen kleinen Einzelstrang-DNA Virus, der mithilfe eines weiteren Moleküls zu Replikation befähigt ist und das Einschleusen von Utrophin in die Muskulatur ermöglicht. Dieser Ansatz konnte bereits Erfolge im Mausmodell (Gilbert et al., 1999) sowie im Menschen erzielen. Der Phänotyp der DMD Patienten wurde durch die Hochregulierung der

Expression von Utrophin vermindert (Guiraud et al., 2019; Davies and Chamberlain, 2019). Dennoch ist es bis zum klinisch qualifizierten Gebrauch der Hochregulierung von Utrophin noch ein weiter Weg.

1.4.6 Tiermodelle für die Muskeldystrophie Duchenne

Seit der Entdeckung der Muskeldystrophie wurden zahlreiche Tiermodelle entwickelt, um den Pathomechanismus besser zu verstehen und um therapeutische Möglichkeiten zu testen. Neben murinen, kaninen und feline Tiermodellen werden u.a. Zebrafische und Fadenwürmer in der Therapieerforschung und -entwicklung verwendet (Berger & Currie, 2012; Selsby et al., 2015; Sharp et al., 1992; Willmann et al., 2009).

In den letzten Jahren legten Mausmodelle den Grundstock für Untersuchungen der Pathogenese der DMD und der Effektivität und Toxizität hinsichtlich therapeutischer Ansätze. Für die Wahl der Mausmodelle sprechen die leichte Haltung, geringere Anschaffungskosten und die schnelle Reproduzierbarkeit. Nachteile der murinen Tiermodelle sind die fehlende Immunreaktion als Antwort auf therapeutische Vektoren und die kleine Körpergröße. Das verkürzte Lebensalter erschwert zusätzlich die Durchführung von Langzeitstudien (Willmann et al., 2009).

1.4.6.1 Die DMD^{mdx}-Maus

In der vorliegenden Arbeit wurde die DMD^{mdx}-Maus (kurz für: C57BL/10ScSn-DMD^{mdx}/J) als Tiermodell für die DMD benutzt (Bulfield et al., 1984). Das Mausmodell von Jackson stammt aus dem genetischen Hintergrund der C57BL/10ScSn. Eine Spontanmutation an der Position 3185 im Exon 23 im Dystrophingen führt zu einem Basenaustausch von C zu T. Anstelle von einem Glutamin-Codon wird ein Stopcodon eingefügt (Sicinski et al., 1989). Der Gendefekt resultiert in einem kompletten Verlust von Dystrophin mit Ausnahme von einem geringen Anteil an revertanten Muskelfasern (Gillis, 1999). Die DMD^{mdx}-Maus wird seit über 30 Jahren als das Standardmodell für Untersuchungen der Muskeldystrophie Duchenne eingesetzt (Willmann et al., 2009).

Die histologischen Veränderungen sowie das klinische Erscheinungsbild der DMD^{mdx}-Maus sollen im Folgenden, denen des DMD-Patienten, gegenübergestellt werden.

Die DMD^{mdx}-Mäuse weisen wie bei DMD-Patienten erhöhte Creatinkinasewerte sowie eine ausgeprägte Muskeldegeneration mit variablen Fasergrößen und zentral lokalisierte Nuclei auf (Bulfield et al., 1984; Nakamura & Takeda, 2011; Abbildung 8). Ein weiteres übereinstimmendes Merkmal, dass sich in DMD Patienten sowie in der DMD^{mdx}-Maus beobachten lässt, ist die Struktur des DGCs an der Neuromuskulären Endplatte. Der DGC akkumuliert an der postsynaptischen Membran der NME. Die motorische Endplatte besteht aus einer Präsynapse der direkt gegenüber ein hochspezialisiertes Sarkolemm liegt. Dieses antwortet mit großer Geschwindigkeit auf die Freisetzung von Azetylcholin aus der Präsynapse. Versuche von Pratt et al. zeigen eine veränderte Struktur an der motorischen Endplatte in der DMD^{mdx}-Maus. Die NME ist fragmentiert und die präsynaptischen Nervenendigungen sind stark verzweigt. Oft werden einzelne verstreute postsynaptische Azetylcholinrezeptoraggregate ohne eine dazugehörige Präsynapse gefunden (Pratt et al., 2015). Diese veränderte Form der Neuromuskulären Endplatten lassen sich beim Menschen wie auch in der DMD^{mdx}-Maus beobachten (Abbildung 9).

Der Schweregrad der fibrotischen Umbauprozesse, sowie der Muskelschwund der unteren Gliedmaßen zeigen geringere Ausprägungen in der DMD^{mdx}-Maus als bei DMD Patienten (Coulton et al., 1988; Dangain & Vrbova, 1984). Gemeinsam ist den DMD Patienten und der DMD^{mdx}-Maus die Beeinträchtigung des Diaphragmas: In DMD Patienten ist das Zwerchfell bereits in frühem Erkrankungsalter durch Binde- und Fettgewebe verdickt (De Bruin et al., 1997) und es kommt zum Kraftverlust, welcher sich klinisch in Hypoventilationen und Hyperkapnie äußert (Beck et al., 2006; Simonds et al., 1998). In der DMD^{mdx}-Maus zeigen sich vergleichsweise ähnliche Ausprägungen hinsichtlich der Fibrose (Gosselin & Williams, 2006), einer reduzierten Kraftentwicklung (Bates et al., 2013) und dem damit verbundenen Verlust der Leistungsfähigkeit (Stevens & Faulkner, 2000).

Durch den progredienten Ersatz der Muskelfasern durch Binde- und Fettgewebe entwickeln auch die Mäuse mit zunehmendem Alter Herzrhythmusstörungen und kardiale Myopathien (Bostick et al., 2010; Wehling-Henricks et al., 2005). Wie auch beim Menschen ist die Kalziumhomöostase in

der Muskulatur beeinträchtigt, wodurch zytosolische Proteasen aktiviert werden können und Muskelfaserschädigungen und Fasernekrosen verschlimmert werden (Turner et al., 1993; Vandebrouck et al., 2002; Zeiger et al., 2010). Der Immunologische Transkriptionsfaktor NF κ B ist in DMD Patienten (Kumar & Boriak, 2003) sowie in der DMD^{mdx}-Maus erhöht (Messina et al., 2011). Mit drei Monaten zeigen sich bei DMD Patienten und in der DMD^{mdx}-Maus veränderte metabolische Prozesse mit einem gesteigerten Sauerstoffverbrauch, einer verminderten kardialen Leistungsfähigkeit und einer erhöhten Membranfragilität (Khairallah et al., 2007).

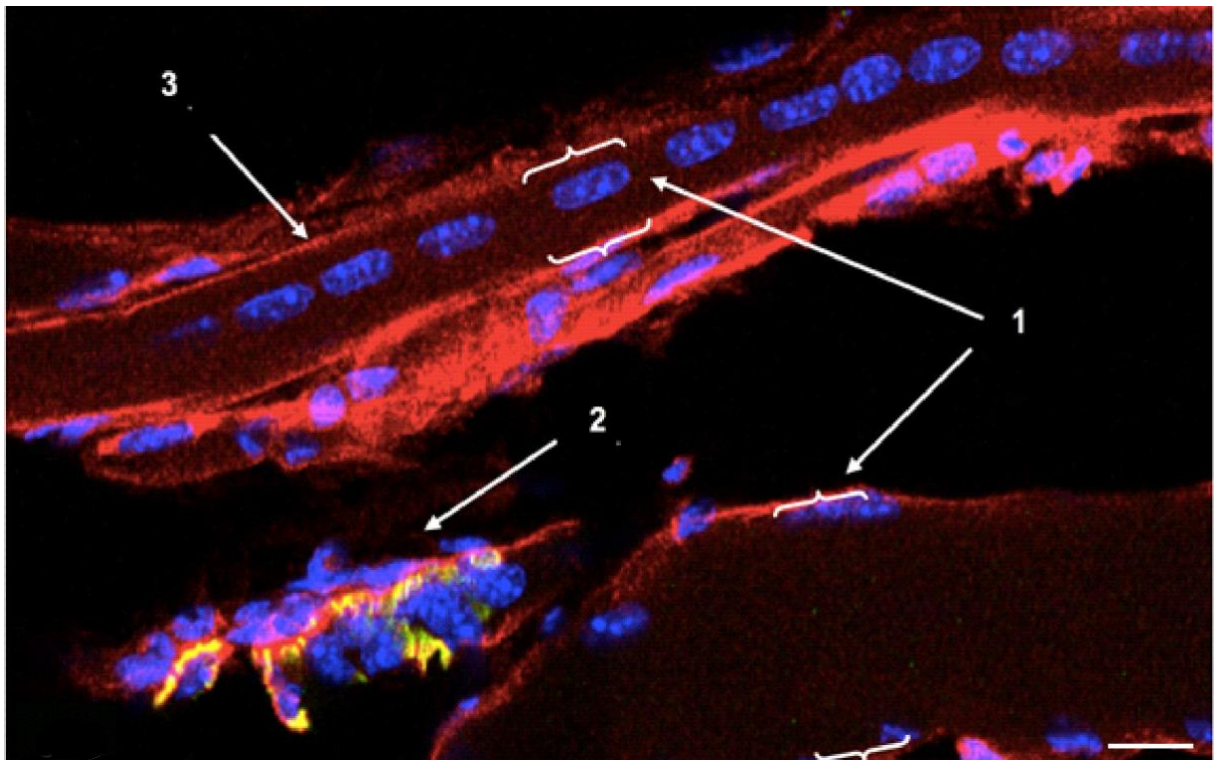


Abbildung 8: Histologie der Skelettmuskulatur in der DMD^{mdx}-Maus: In der Abbildung ist ein Ausschnitt aus dem M. soleus einer DMD^{mdx}-Maus zu sehen. Der Pfeil (1) deutet auf die unterschiedlichen Faserkaliber. Pfeil (2) zeigt auf eine fragmentierte Neuromuskuläre Endplatte und durch Pfeil (3) sind die zentralisierten Zellkerne zu sehen. Die Zellkerne sind mit DAPI in blau dargestellt. Die AChR wurden mit α -Bungarotoxin (grün) markiert. Die Antikörper gegen Utrophin markieren das Sarkolemm rot. (Maßstab: 10 μ m)

Trotz der hier angeführten klinischen und histologischen Ausprägungen zeigt die DMD^{mdx}-Maus im Unterschied zu den DMD-Patienten eine fast normale Lebenserwartung (Chamberlain et al., 2007) und einen milderen Phänotyp. Dies lässt sich erklären durch eine höhere regenerative Kapazität der Satellitenzellen, die der Degeneration der Muskelfasern entgegenwirkt. Zusätzlich könnte durch eine Hochregulierung der Utrophinexpression die Abwesenheit von Dystrophin funktionell kompensiert werden (Khurana et al., 1991).

In der nicht-dystrophischen adulten Muskulatur ist Utrophin auf die Neuromuskuläre Endplatte beschränkt. Im Gegensatz dazu ist Utrophin in der dystrophindefizienten, adulten Muskulatur an den NME, den Muskel-Sehnen-Übergängen (MTJ) sowie im gesamten Sarkolemm vorhanden (Keep, 2000). Diese Hochregulierung von Utrophin stellt dadurch die Integrität der Plasmamembran wieder her, stabilisiert die Muskelfaser und wirkt den degenerativen Prozessen entgegen (Gilbert et al., 1999). Die „dko-Maus“, welcher neben Dystrophin zusätzlich Utrophin fehlt, zeigt einen sehr schweren, progressiveren Krankheitsverlauf, vergleichbar mit der Ausprägung der DMD im Menschen. Ihre Lebenserwartung beträgt wenige Wochen (Deconinck et al., 1997; Grady et al., 1997) und unterstreicht somit die funktionelle Bedeutung von Utrophin.

Der mildere Phänotyp in der DMD^{mdx}-Maus lässt sich neben der Hochregulierung von Utrophin und der erhöhten Satellitenzellenkapazität in einer geringeren mechanischen Belastung erklären. Dies zeigt sich an Studien von Archer et al.: Wird die DMD^{mdx}-Maus zu körperlichen Bewegungen angeregt resultieren Muskelfasernekrosen und Mikroläsionen bereits nach 12 (Nakae et al., 2012) sowie nach 48 Stunden (Archer et al., 2006). Erzwungene Bewegungen verschlimmern den Phänotyp zunehmend (Pierno et al., 2007).

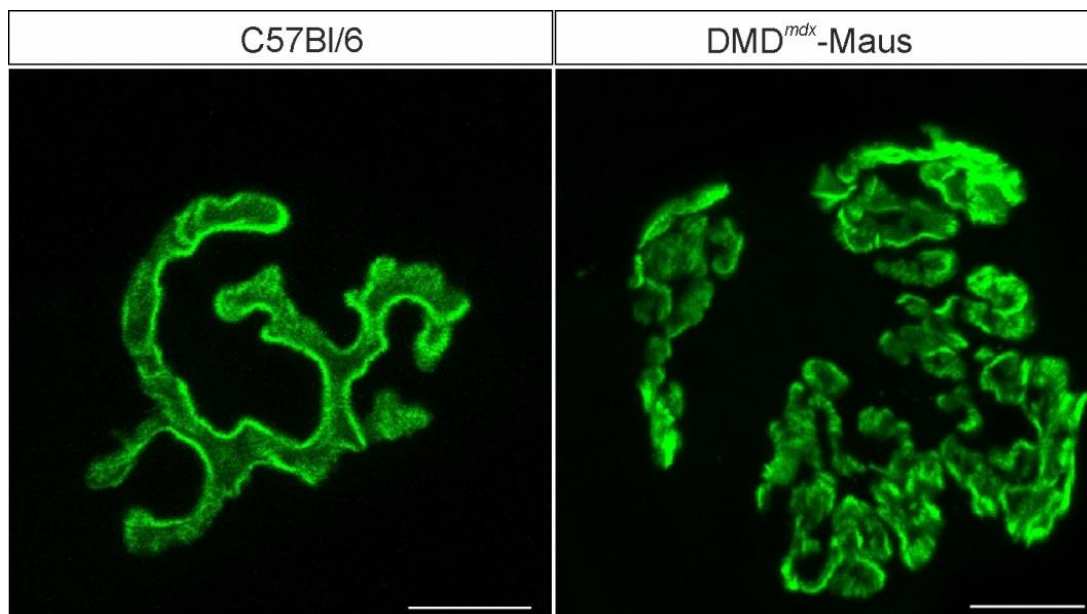


Abbildung 9: Neuromuskuläre Endplatte in der DMD^{mdx}-Maus: Die Abbildung zeigt eine Neuromuskuläre Endplatte in der wildtyp-Maus (C57Bl/6) (A) und in der DMD^{mdx}-Maus (B). In der DMD^{mdx}-Maus sind deutlich die fragmentierten Strukturen zu sehen. Die AChR wurden mit α -Bungarotoxin (grün) markiert. (Maßstab: 10 μ m)

2 Zielsetzung der Arbeit

Das Fehlen von Dystrophin führt zur Muskeldystrophie vom Typ Duchenne, welche durch einen progressiven Muskelschwund charakterisiert ist (Bushby et al., 2010). Die Patienten besitzen eine erhöhte Fallneigung und Gangunsicherheit (Hsu & Furumasu, 1993). Dafür könnte eine eingeschränkte Propriozeption verantwortlich sein.

Um dieser Hypothese nachzugehen habe ich die Morphologie von Muskelspindeln in der DMD^{mdx}-Maus quantitativ molekular und strukturell untersucht. Speziell analysiert wurden:

- (1) Die Verteilung der Komponenten des DGC-Komplexes, insbesondere Dystrophin und Utrophin und die Verteilung von β -Dystroglykan in der Muskelspindel von zwei wildtyp-Mauslinien sowie der DMD^{mdx}-Maus.
- (2) Veränderungen in der Anzahl der Umwindungen der sensorischen Afferenzen an den intrafusalen Muskelfasern in allen drei Mausmodellen.
- (3) Die Anzahl der Muskelspindeln im M. soleus in der DMD^{mdx}-Maus, in der C57Bl/6-Maus und in der C57Bl/10SnJ-Maus um degenerative Prozesse von Intrafusalfasern zu bestimmen.

Zusammenfassend dienen die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit dazu, eine veränderte Funktion von Muskelspindeln mit strukturellen Veränderungen zu korrelieren und durch diese Erkenntnisse über Muskelspindeln die Fallneigung und Gangunsicherheit bei Patienten mit Duchennscher Muskeldystrophie besser zu verstehen.

3 Materialien

3.1 Verwendete Chemikalien

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Firma	Katalognummer
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH + Co. KG	Art-Nr. 8076.2
Anti-Bungarotoxin Alexa488	Invitrogen	B13422
Anti-Maus	Invitrogen	A11032
Anti-Kaninchen	Invitrogen	A11037
Anti-Meerscheinchen	Millipore	AP1493SD
DAPI (1:10000)	Carl Roth GmbH + Co. KG	6335.1
Ethanol, 80 %	Carl Roth GmbH + Co. KG	Art-Nr. T913.3
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG	0335.1
Ketaminhydrochlorid (Ketavet) 100 mg/mL	Bela-Pharm	
Mowiol-488 (Aqua-Poly/Mount)	Polysciences Europe GmbH	18606
Tissue Tec® 4583 O.C.T.™ Compound	A. Hartenstein Laborbedarf für die Forschung	TTEK
Triton® X-100	Sigma Aldrich	CAS Nr. 9002-93-1
Xylazin	Bayer	

3.2 Antikörper

Tabelle 2: Liste der Erstantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma	Katalognummer
Anti-Utrophin (N-Terminus) DRP3/20C5	Maus	1:4	Leica Biosystem	DRP2-CE (Bewick et al., 1992).
Anti-Beta-Dystroglykan 43 DAG	Maus	1:75	Leica Biosystem	Ref. Nr. B-DG-CE (Pogue et al., 2001)
Anti-Dystrophin Rb-9024	Kaninchen	1:100	Thermo Scientific	RB-9024-P0 (Vulin et al., 2015)
Anti-vesikulärer Glutamattransporter 1	Meerschweinchen	1:10 000	Millipore	AB5905 (Milnerwood et al., 2012)

Tabelle 3: Liste der Zweitantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma	Katalognummer
Anti-Kaninchen (Alexa594)	Ziege	1:1000	Invitrogen	A11037
Anti-Maus (Alexa594)	Ziege	1:1000	Invitrogen	A21125
Anti-Meerschweinchen (Cy2)	Esel	1:500	Millipore	AP1493SD

Zur Darstellung der Zellkerne wurde 4', 6'-diamidino-2-phenylindol (DAPI) genutzt. Die Markierung der Azetylcholinrezeptoren erfolgte mit α -Bungarotoxin (ThermoFisher Scientific, Spezies: Bungarus multicinctus), welches mit dem Fluorophor Alexa488 konjugiert war.

3.3 Hilfsmittel

Tabelle 4: Liste der Hilfsmittel

Geräte	Firma
Inverses Lichtmikroskop	Carl Zeiss AG
LSM 700 Module mit Imager M2, Power supply 232, HXP 120 C and camera AxioCam MRm	
Laser-scanning-confocal microscope; LSM 710 Module with AxioImager Z.1, power supply 231, MCU 2008, HXP 120.	Carl Zeiss AG
Laser: Diode 405-30, HeNe633, DPSS 561-10 and Argon	
Kryostat LEICA CM3050S	Leica Biosystems
Tischzentrifuge	Labnet International, Inc.
Vortex REAX 1	Heidolph Instruments
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH
Präzisionswaage PLJ 2100-2M	Kern + Sohn GmbH
pH-Meter InoLab 720	WTW GmbH
Pipetten	Gilson GL28557, Gilson GK26459, Gilson H22358E, GG27965 and N100206

3.4 Verbrauchsmittel

Tabelle 5: Liste der Verbrauchsmittel

Beschreibung	Firma
Deckgläschen (24x50 mm)	Carl Roth GmbH + Co.
Handschuhe	Meditrade GmbH, Kiefersfelden
Pipettenaufsätze (20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	SASTEDT
Parafilm PM-966	Parafilm
„Safelock Tubes“ (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf

3.5 Puffer und Lösungen

3.5.1 Gewebepräparation für die Immunhistochemie

Tabelle 6: Zusammensetzung der Narkoselösung

Narkoselösung	
8 ml	Saline (NaCl-Lösung)
1 ml	Ketavet
1 ml	Xylazin

Die Narkoselösung wurde mit 10 µl pro g Körpergewicht dosiert. Die männlichen Mäuse hatten üblicherweise ein Gewicht von etwa 30g.

Tabelle 7: Zusammensetzung des 20 % Paraformaldehyd

20 % Paraformaldehyd (PFA) Vorratslösung	
67 g	Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat in 800 ml H ₂ O
200 g	PFA
ca. 10 ml	Natriumhydroxid

Die PFA-Lösung wurde durch Papierfilter filtriert und 2 Liter H₂O hinzugefügt. Anschließend wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt.

3.5.2 Immunhistochemie

Tabelle 8: Zusammensetzung der PBS

10x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	
8,0 g	Natriumchlorid
0,2 g	Kaliumchlorid
1,42 g	Di-Natriumhydrogenphosphat
0,27 g	Kaliumhydrogenphosphat

Ergibt 1 Liter Lösung PBS (*Molecular cloning: a laboratory manual* Quelle Sambrook)

Tabelle 9: Zusammensetzung der Blocking Solution**Blocking Solution für 100ml**

98 ml	1x PBS
500 µl	Triton x-100
1 g	BSA (von engl. bovine serum albumin)
500 µl	Ziegen-Serum

3.6 Präparationshilfen**Tabelle 10:** Liste der Präparationshilfen

Präparationshilfen	Hersteller
Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit	Biesterfeld Spezialchemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Black Anodized Insect Pins – Size 1	FINE SCIENCE TOOLS GmbH, Heidelberg, Deutschland
Vannas-Tübingen Spring Scissors – 5 mm Blades Straight	FINE SCIENCE TOOLS GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dumont #5 Forceps – Inox Biologie	FINE SCIENCE TOOLS GmbH, Heidelberg, Deutschland
Iris Scissors – ToughCut Straight 9 cm	FINE SCIENCE TOOLS GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tissue Forceps 2x3 Teeth 14.5 cm	FINE SCIENCE TOOLS GmbH, Heidelberg, Deutschland
Standard Pattern Scissors – Large Loops Sharp/Blunt 14.5 cm	FINE SCIENCE TOOLS GmbH, Heidelberg, Deutschland

3.7 Computerprogramme**Tabelle 11:** Liste der Computerprogramme

Beschreibung	Firma
ImageJ	Public domain Java image processing program from NIH, USA (rsbweb.nih.gov/ij/)
Zen 2011	Zeiss
GraphPad Prism 7	Graphpad Software, San Diego, CA
CorelDRAW Graphics Suite 2017	CorelDRAW
Power Point 2017 Version 15.36	Microsoft

4 Methoden

4.1 Tiere

Es wurden sieben zehn Wochen alte Mäuse aus dem Zuchtstamm C57BL/10ScSn-DMD^{mdx}nJ (im Folgenden: DMD^{mdx}-Mäuse) von Jackson Laboratory untersucht. Bis zur Verwendung wurden sie am biomedizinischen Centrum der "LMU Core Facility Animal Models" gehalten. Die wildtyp-Mäuse vom Zuchtstamm C57Bl/10SnJ wurden von Jackson Laboratory, die C57Bl/6 Mäuse von Janvier Labs (Le Genest Saint Isle Saint Berthevin, Frankreich) kommerziell erworben. Insgesamt wurden vier Tiere aus der Bl10-Linie und 4 Tiere aus der Bl6-Linie verwendet. Da die DMD^{mdx}-Maus einen C57Bl/10SnJ Hintergrund besitzt, wurde eine wildtyp-Maus vom gleichen Hintergrundstamm gewählt. Im Rahmen der Forschung zur Muskeldystrophie Duchenne findet die C57Bl/6-Maus die breiteste Anwendung. Um einen besseren wissenschaftlichen Kontext herstellen zu können wurden zusätzlich zur C57Bl/10SnJ die C57Bl/6-Mäuse als weiterer wildtyp-Stamm untersucht. Der Tag/Nacht Rhythmus der Mäuse wurde bei einer Raumtemperatur von 22°C ± 2°C in einem 12h zu 12h Verhältnis festgelegt.

4.2 Aufarbeitung des Gewebes

In der vorliegenden Arbeit wurden die M. soleus der drei Mauslinien untersucht. Zur optimalen Erhaltung der Gewebestruktur des Muskels wurde eine Fixierung mittels transkardialer Perfusion durch Frau Dr. Corinna Haupt durchgeführt (Gage et al., 2012). Jedem Tier werden 10 µl pro Gramm Körpergewicht der Narkoselösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 6) verabreicht. Mithilfe einer Pinzette wurden die Reflexe in den Zehen getestet, um den Bewusstseinsgrad zu bestimmen. Erst wenn die Reize unbeantwortet blieben, keine Reflexantwort mehr zu erkennen war und die Tiere keinerlei Schmerzempfindlichkeit mehr zeigten, wurden sie auf einer Styroporplatte fixiert. Nach der Thoraxöffnung und der Freilegung des Herzens wurde in den linken Ventrikel eine Nadel platziert. Anschließend wurde der rechte Vorhof geöffnet, und mit einer Geschwindigkeit von 3 ml/min PBS 15 Minuten lang eingeleitet. Als Indiz für eine erfolgreiche Perfusion diente die Aufhellung der Leber. Danach wurde zu 4% Paraformaldehyd-Fixierlösung (PFA) gewechselt, welche 20 Minuten lang in die adulten Mäuse eingebracht wurde. Die Perfusionsfixierung

sowie alle weiteren Experimente wurde von der Regierung von Oberbayern im Rahmen eines Tierversuchsantrags genehmigt (Az.: ROB-55.2-2532.Vet_02-17-82, 55.2-1-54-2532.8-160-13 und 55.1-8791-14.587). Die hinteren Extremitäten wurden präpariert und enthäutet. Über Nacht wurde mittels einer 30%-Sukrose-Lösung osmotisch Wasser entzogen und das Fixativ entfernt. Der M. soleus wurde behutsam von den fixierten Hinterbeinen herauspräpariert, direkt in TissueTec® eingebettet und bei -20 °C eingefroren. Das Gewebe wurde mittels des Kryostaten bei Temperaturen zwischen -17°C und -20°C parallel zu den Extrafusalfasern geschnitten. Die 20 µm dicken Muskelschnitte wurden auf SuperFrost-Objektträger gesammelt und bei -20°C gelagert.

4.3 Immunhistochemie

Zur immunhistochemischen Analyse wurden die bei -20°C gelagerten Schnitte auf Objektträgern 30 Minuten lang bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend mit PBS 10 Minuten gewaschen um die Rückstände des TissueTec® zu entfernen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit der Blocklösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 11) inkubiert. Um ein Austrocknen der Muskelschnitte zu verhindern, wurden die Objektträger mit Parafilm bedeckt. Anschließend wurden die in Blocklösung verdünnten Erstantikörper in den jeweiligen Verdünnungen (siehe Tabelle 2) auf die Schnitte aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag folgten vier Waschschrte mit PBS von je 8 Minuten. Die Objektträger wurden mit dem Zweitantikörper und dem α -Bungarotoxin 90 Minuten lang bei Raumtemperatur in den entsprechenden Verdünnungen (siehe Tabelle 3) inkubiert. Um ein Ausbleichen der Fluoreszenz zu verhindern, wurden die Objektträger während der Inkubation in abgedunkelten Behältern aufbewahrt. Es folgten drei Waschschrte mit PBS von je 8 Minuten. Die Gewebeschnitte wurden 10 Minuten lang bei Raumtemperatur mit 4', 6' Diamidino-2-phenylindole (DAPI) in einer Verdünnung von 2 ng/µl zur Markierung der Zellkerne inkubiert und anschließend viermal mit PBS für 8 Minuten ausgewaschen. Die Objektträger wurden sorgfältig mit Mowiol (Aqua-Poly/Mount; Polysciences Europe GmbH) bestrichen, mit Deckgläschen abgedeckt und bei 4°C dunkel gelagert. Negativkontrollen wurden stets parallel zu den Färbungen prozessiert, um die Spezifität der Färbungen zu gewährleisten. In der Negativkontrolle wurde

der primäre Antikörper weggelassen und die Gewebeschnitte nur mit dem jeweiligen Zweitantikörper inkubiert.

4.4 Dokumentation und Datenanalyse

Die Untersuchung der immunhistochemisch markierten Muskelschnitten erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Das konfokale Mikroskop von Zeiss war mit vier Lasern ausgestattet: Diode 405-30 (405 nm, max. power 30.0 mW), HeNe633 (633 nm, max power 5.0 mW), DPSS 561-10 (561 nm, 15.0 mW) und Argon (458 nm, 488 nm und 514 nm, max power 25.0 mW). Optional wurden 10-15 „Z-Stackaufnahmen“ mit dem 40x Objektiv und mit einer Intervalldicke von 1-2 μm durchgeführt. In allen Aufnahmen wurden die Scangeschwindigkeit von 6, die „Pinholegröße“ sowie die Auflösung von 1024x1024 beibehalten. Z-Stackaufnahmen wurden danach auf eine Ebene mittels der Funktionen „Maximalintensitätsprojektion“ reduziert. Damit konnten beispielsweise die annulospiralen Windungen um die Intrafusalfaser nachverfolgt werden. Des Weiteren wurden die Bilder mit einer Signalmittelung (Average-Funktion) von 4-8 aufgenommen. Dabei wird jede Zeile des Bildes mehrmals abgetastet und die Intensitätswerte gemittelt. Die Aufnahmen wurden als „.ism“-Dateien (AIM Application Dokument) gespeichert und mit dem Programm ZEN 2011 bearbeitet. Helligkeit und Kontrast des gesamten Bildes wurden mit dem gleichen Programm optimiert. Die Funktion „Median“ wurde in allen Bildern in gleicher Intensität angewendet.

Die gesammelten Daten der Auszählungen der Umwindungen sowie die Anzahl der Muskelspindeln, werden als Mittelwert plus Standardabweichungen angezeigt. Die statistische Signifikanz wurde mit einfaktoriellen ANOVAs mittels multiplen Vergleiches errechnet. Der signifikante Unterschied der Mittelwerte wurde mit einem $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ für hochsignifikant (**) und $p < 0,005$ (***) für höchstsignifikant gewählt.

4.5 Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen

4.5.1 Analyse der Neuromuskulären Endplatte und der Muskelspindel

Aus einem Mausmuskel wurden zwischen 100 und 130 Schnitte gefertigt. Durchschnittlich war eine Muskelspindel unter 12 Gewebeschnitten aufzufinden. Um die Muskelspindeln in der Masse des Muskelgewebes eindeutig zu identifizieren, dienten folgende Merkmale:

- (1) Die typische Morphologie der annulospiralen Endigungen, die mit Antikörpern gegen den vesikulären Glutamatttransporter (VGluT1) markiert werden konnten;
- (2) Typische Zellkernaggregate der Intrafusalfasern, angefärbt mit DAPI;
- (3) Der geringere Durchmesser der Intrafusalfasern im Vergleich zu den Extrafusalfasern;
- (4) Die mit Dystrophin oder β -Dystroglykan markierte Kapsel der Muskelspindel.

Die Neuromuskulären Endplatten ließen sich mit α -Bungarotoxin, das an die nikotinischen Azetylcholinrezeptoren der postsynaptischen Membran bindet, nachweisen.

4.5.2 Quantitative Analyse der Anzahl der Umrundungen

Um zu untersuchen, ob die Mutation im *DMD* die Anzahl und die Struktur der Umrundungen der sensorischen Innervierung beeinflusst, wurden insgesamt 60 Muskelspindeln aus 3 Mäusen pro Mauslinie untersucht. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden Abschnitte von 50 μm Länge ausgewählt. Der Durchmesser der intrafusalen Fasern betrug zwischen 8 μm und 10 μm . Die sensorischen Endigungen wurden mit VGluT1 in allen Tieren nach dem gleichen Färbeprotokoll immunhistochemisch markiert. Ein Beispiel solch einer Auszählung ist in der Abbildung 10 zu sehen:

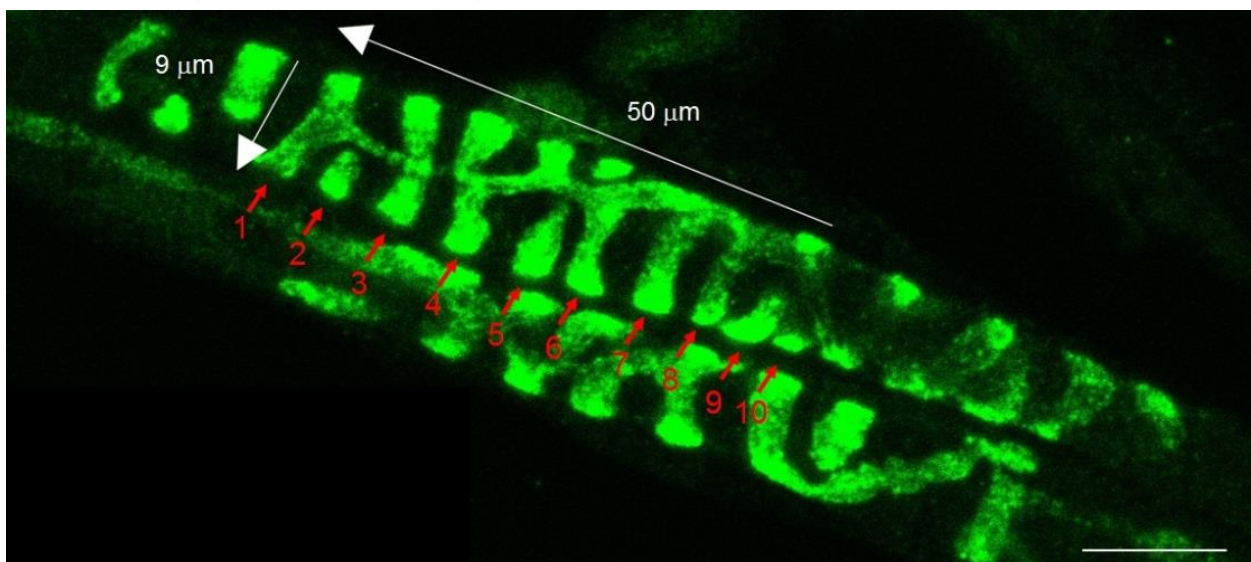


Abbildung 10: Darstellung einer Muskelspindel. Mithilfe von VGluT1 (grün) wurden die sensorischen Endigungen markiert. Der definierte Durchmesser einer intrafusalen Faser von 8-10 μm sowie die definierte Länge von 50 μm sind anhand der weißen Pfeile zu erkennen. Die roten nummerierten Pfeile kennzeichnen die ausgezählten Umrundungen der sensorischen Afferenz. (Maßstab: 10 μm)

4.5.3 Quantitative Analyse der Anzahl der Muskelspindeln

Zur quantitativen Bestimmung der Anzahl der Muskelspindeln in den M. soleus dienten „Tiliscanaufnahmen“, die mittels der Epifluoreszenzmikroskopie erhalten wurden. Ein Muskel wurde auf 8-10 Objektträger mit je 10 Gewebeschnitten in kontinuierlicher Reihenfolge aufgezogen. Insgesamt wurden pro Muskel zwischen 106 und 131 Gewebeschnitte untersucht. Durch Übersichtsaufnahmen, sog. „TileScans“, konnten die Muskelspindeln identifiziert und lokalisiert sowie ihre Anzahl bestimmt werden. Mithilfe der kontinuierlichen Schnittreihenfolge konnte eine vollständige und exakte Auswertung gewährleistet werden.

5 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen zur Verteilung der Komponenten des DGCs in den Muskelspindeln, der Häufigkeit der sensorischen Umwindungen an den intrafusalen Fasern und der Anzahl der Muskelspindeln im bei der DMD^{mdx} Maus dargestellt. Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit besteht in der Lokalisation von Dystrophin, Utrophin und β -Dystroglykan an den intrafusalen Fasern von wildtyp-Mäusen und von DMD^{mdx}-Mäusen, um den Pathomechanismus der DMD besser zu verstehen.

5.1 Verteilung von Dystrophin, Utrophin und β -Dystroglykan in Neuromuskulären Endplatten

Um die Spezifität der verwendeten Antikörper zu untersuchen, wurden neuromuskuläre Endplatten (NME) analysiert. Dort wurde die Verteilung bereits ausführlich dokumentiert und gezeigt, dass Dystrophin, β -Dystroglykan sowie Utrophin an der NME konzentriert vorliegen (Bewick et al., 1993; Gee et al., 1998). Dystrophin und β -Dystroglykan sind außerdem am Sarkolemm in der Skelettmuskulatur von adulten wildtyp-Mäusen vorhanden. Als Einstieg in die immunhistochemische Analyse der Komponenten des DGC in Muskelspindeln bestand das erste Ziel in der Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse.

Mithilfe von α -Bungarotoxin kann die postsynaptische Membran der NME gut dargestellt werden, da nikotinische AChR in der adulten Skelettmuskulatur ausschließlich an der NME konzentriert sind. Die Antikörper gegen Utrophin, Dystrophin und β -Dystroglykan wurden mit einem rot-fluoreszierenden Zweitantikörper detektiert. Exemplarisch wird für jedes untersuchte Protein je eine motorische Endplatte pro Mausstamm abgebildet.

Abbildung 11 zeigt Färbungen für Dystrophin an der NME vom M. soleus in der C57Bl/6-, der C57Bl/10SnJ- und in der DMD^{mdx}-Maus. In den wildtyp-Mauslinien zeigten sich eine deutliche Färbung des Sarkolemm (Pfeil) sowie eine Akkumulation der Immunreaktivität an der neuromuskulären Endplatte (Stern). Da die DMD^{mdx}-Maus kein Dystrophin exprimiert, ist die Färbung für Dystrophin negativ, was die Spezifität der verwendeten Antikörper zeigt. Zusätzlich waren Endplatten aus DMD^{mdx}-Mäusen fragmentiert, verglichen mit Endplatten aus dem gleichen Muskel von wildtyp-Mäusen. Dies wurde bereits früher beschrieben (Pratt et al., 2015).

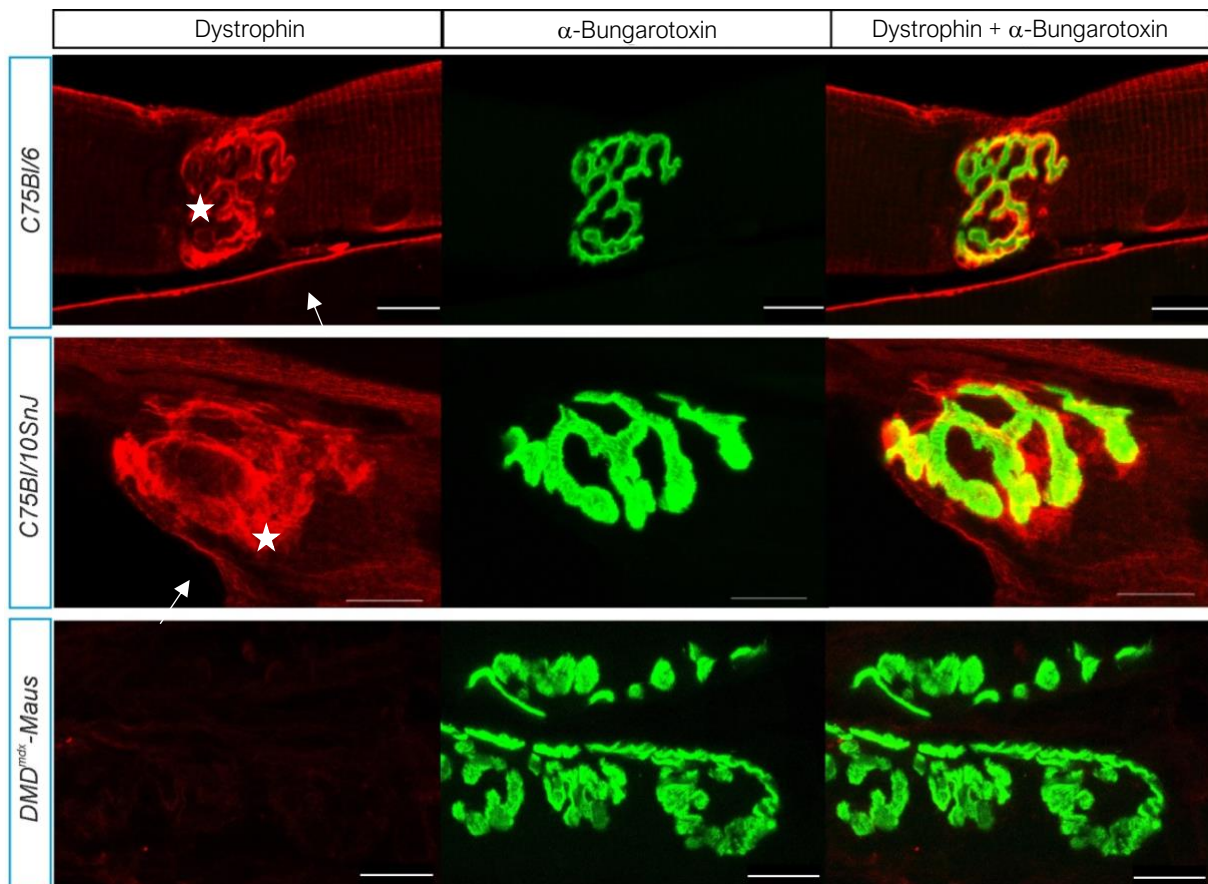


Abbildung 11: Übersicht der Färbungen für Dystrophin in der NME im M. soleus in der C57Bl/6-, der C57Bl/10SnJ- und der DMD^{mdx}-Maus. Die NME wurde mit einem an den nikotinergen Azetylcholinrezeptor bindenden Neurotoxin, dem α -Bungarotoxin (grün), angefärbt. Die Antikörper gegen Dystrophin fluoreszieren rot. Dystrophin färbt in beiden wildtyp-Mauslinien das Sarkolemm (Pfeil) und ist an den NME konzentriert (Stern). Die NME der DMD^{mdx}-Maus zeigt weder am Sarkolemm noch an den NME Färbungen für Dystrophin. (Maßstab: 10 μ m)

In der Abbildung 12 sind Färbungen für β -Dystroglykan in der NME in allen drei Mauslinien dargestellt. Motorische Endplatten aus wildtyp-Mäusen zeigten eine deutliche Anfärbung mit Antikörpern gegen β -Dystroglykan. Eine Abnahme des Proteins in der DMD^{mdx}-Maus wurde nicht beobachtet. Zusätzlich ließ sich eine leichte Anfärbung des Sarkolemmms in der DMD^{mdx}-Maus wie auch in den wildtyp-Stämmen zeigen.

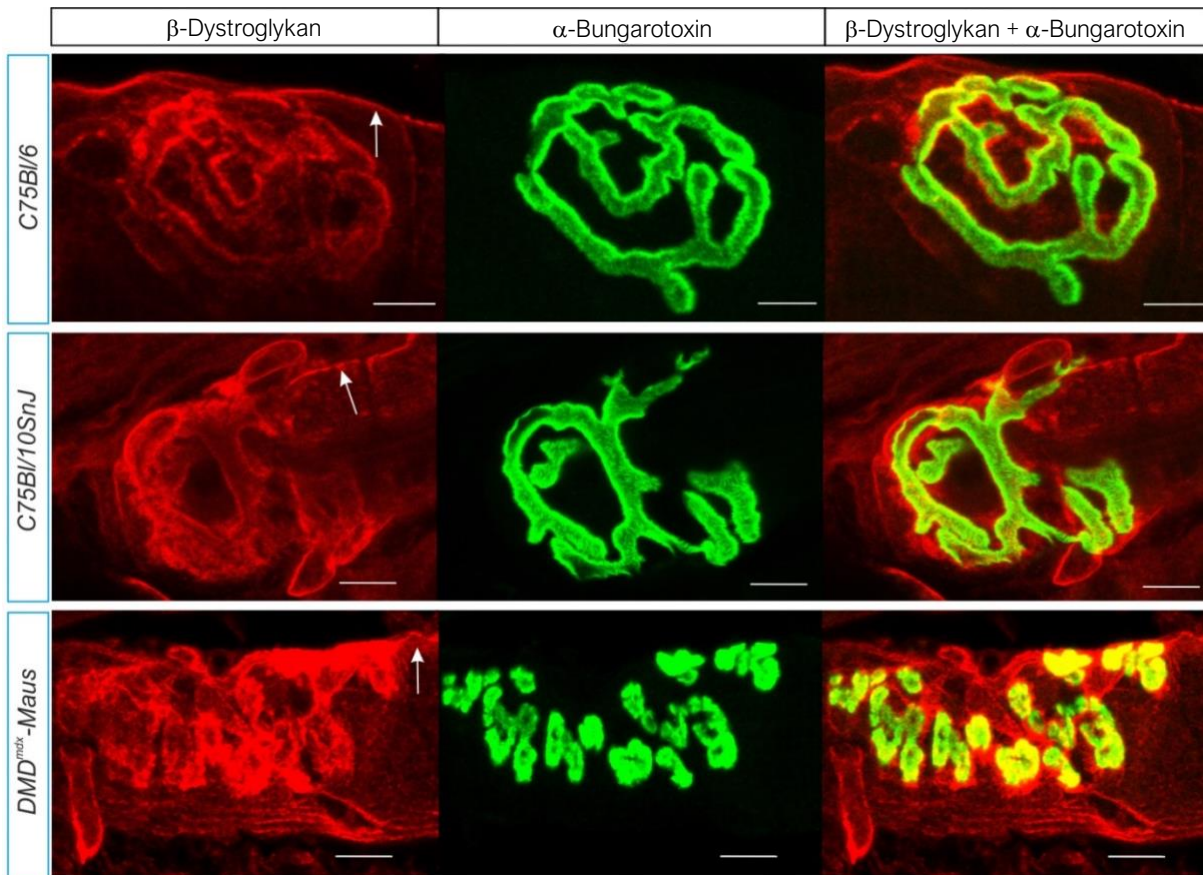


Abbildung 12: Übersicht der Färbungen für β -Dystroglykan in der NME im M. soleus in der C57Bl/6-, der C57Bl/10SnJ- und der DMD^{mdx}-Maus: Die NME wurden mit Alexa488-konjugiertem α -Bungarotoxin markiert. Beta-Dystroglykan ist mit einem rot-fluoreszierendem Zweitantikörper markiert. Die Immunreaktivität von β -Dystroglykan ist deutlich am Sarkolemm der Muskelzellen in allen drei Mauslinien zu erkennen (Pfeil). Es lassen sich nur geringe Unterschiede der Intensität der Immunreaktivität zwischen den wildtyp-Mauslinien und der DMD^{mdx}-Maus ausmachen. (Maßstab: 10 μ m)

In allen drei Mauslinien, den wildtyp-Mäusen sowie der DMD^{mdx}-Maus, war eine positive Färbung für Utrophin an den Neuromuskulären Endplatten festzustellen (Abbildung 13). Am Sarkolemm ist Utrophin weder in der C57Bl/6-Maus (C57Bl/6) noch in der C57Bl/10SnJ-Maus (C57Bl/10SnJ) vorhanden. Im Gegensatz dazu ließ sich die Hochregulierung von Utrophin am Sarkolemm der dystrophischen Maus nachweisen. Diese Veränderung wurde bereits früher beschrieben (Hirst et al., 2005) und damit stützen die Ergebnisse der Studie die Spezifität der verwendeten Antikörper.

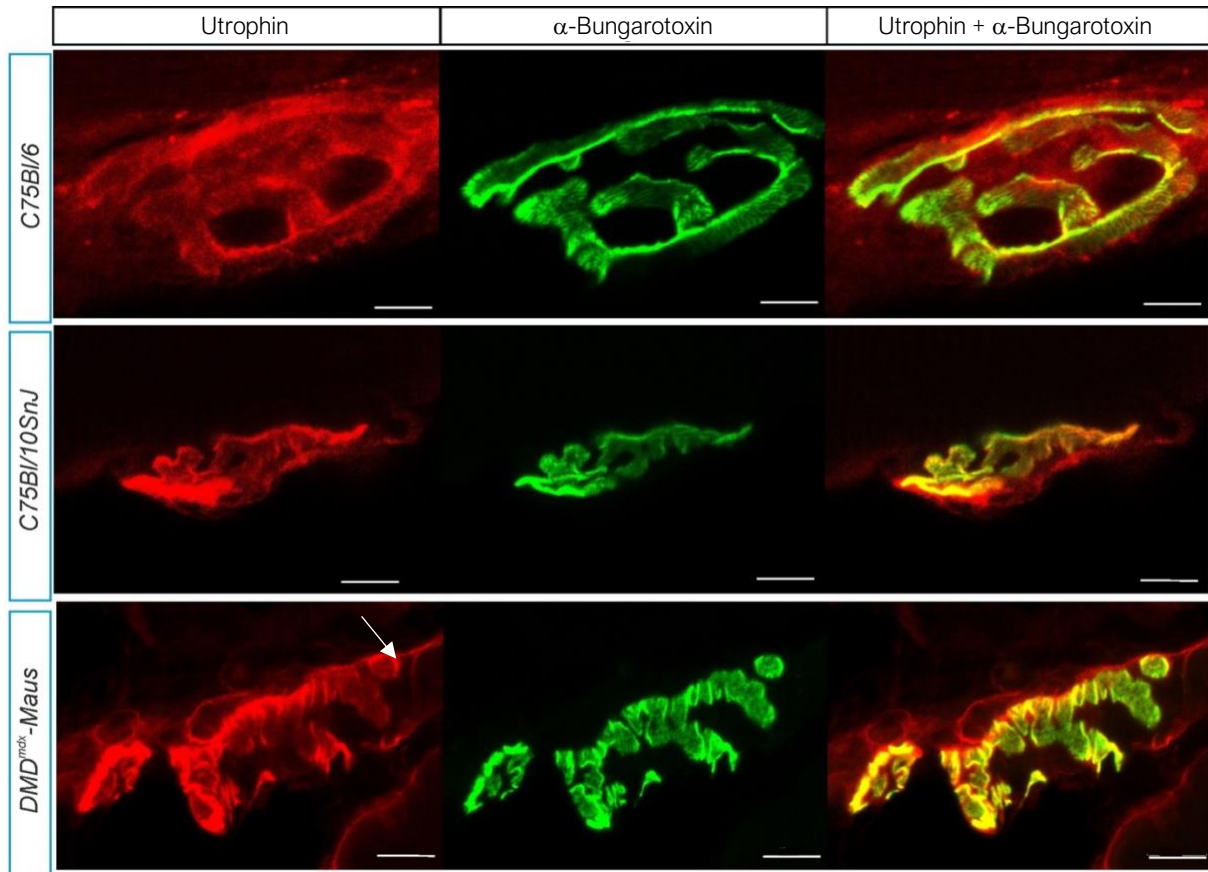


Abbildung 13: Übersicht der Färbungen für Utrophin in der NME im M. soleus in der C57Bl/6-, der C57Bl/10SnJ- und der DMD^{mdx}-Maus: AChR wurden mit α -Bungarotoxin (grün) markiert. Utrophin ist im roten Kanal dargestellt. Im Gegensatz zu Dystrophin, welches über das gesamte Sarkolemm in normalen Muskelfasern exprimiert ist, akkumuliert Utrophin präferentiell an den NME in normalen und in dystrophischen Geweben. Am Sarkolemm ist in den wildtyp-Mäusen keine Färbung von Utrophin wahrzunehmen. In der dystrophischen DMD^{mdx}-Maus färbt Utrophin neben der NME auch das Sarkolemm an (Pfeil).

5.2 Verteilung von Dystrophin, Utrophin und β -Dystroglykan in Muskelspindeln

Um zu untersuchen, ob Dystrophin, Utrophin und β -Dystroglykan in den Muskelspindeln in wildtyp-Mäusen und in der DMD^{mdx}-Maus vorhanden sind, und um deren Verteilung innerhalb der Spindeln zu bestimmen, wurden insgesamt neun M. soleus aus den drei Tierstämmen präpariert. Die Muskeln wurden wie im Material- und Methodenteil beschrieben angefärbt. Die Anfärbung der annulospiralen Endigungen mit Antikörpern gegen den VGLUT1 diente zur genauen Lokalisation der untersuchten Proteine innerhalb des zentralen Bereichs der Intrafusalfasern.

5.2.1 Die Lokalisation von Dystrophin in der Muskelspindel

In den wildtyp-Linien der C57Bl/6 (Abbildung 14) und der C57Bl/10SnJ (Abbildung 15) zeigte sich eine streifenähnliche Verteilung von Dystrophin. Das Protein war zwischen den annulospiralen Endigungen am Sarkolemm konzentriert. In dem Bereich der Intrafusalfaser, die im direkten Kontakt mit der sensorischen Endigung steht, war Dystrophin ausgespart. Diese Verteilung von Dystrophin in Muskelspindeln von wildtyp-Mäusen wurde bereits von Nahirney und Ovalle ausgeführt (Nahirney & Ovalle, 1993). Diese Beschreibung erfolgte ausschließlich an der C57Bl/6-Maus. Meine Untersuchungen zeigen, dass diese Verteilung auch in der C57Bl/10SnJ gefunden wird.

Im Gegensatz zu wildtyp-Mäusen konnte in DMD^{mdx}-Mäusen kein Dystrophin im zentralen Bereich der Intrafusalfasern nachgewiesen werden (Abbildung 16). Somit führt die DMD nicht nur in Extrafusalfasern sondern auch in Intrafusalfasern zur Abwesenheit von Dystrophin am Sarkolemm in DMD^{mdx}-Mäusen.

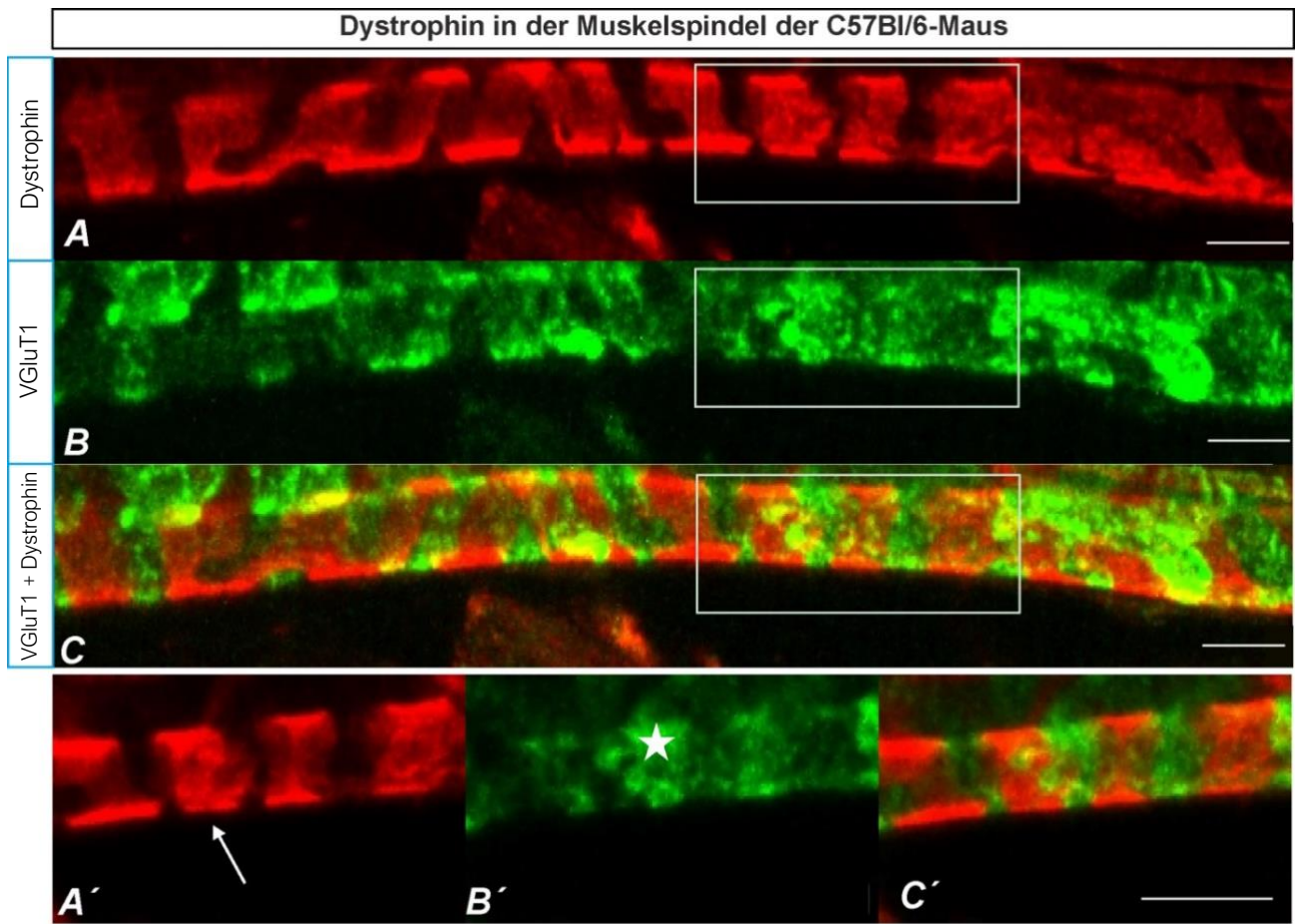


Abbildung 14: Dystrophin in der Muskelspindel der C57Bl/6-Maus. Dystrophin ist in rot dargestellt. VGluT1 (grün) färbt die annulospiralen Endigungen (Stern) in der Intrafusalfaser an. In der dargestellten intrafusalen Faser ist das Dystrophin deutlich zwischen den annulospiralen Endigungen zu erkennen (Pfeil). (Maßstab: 10 μ m)

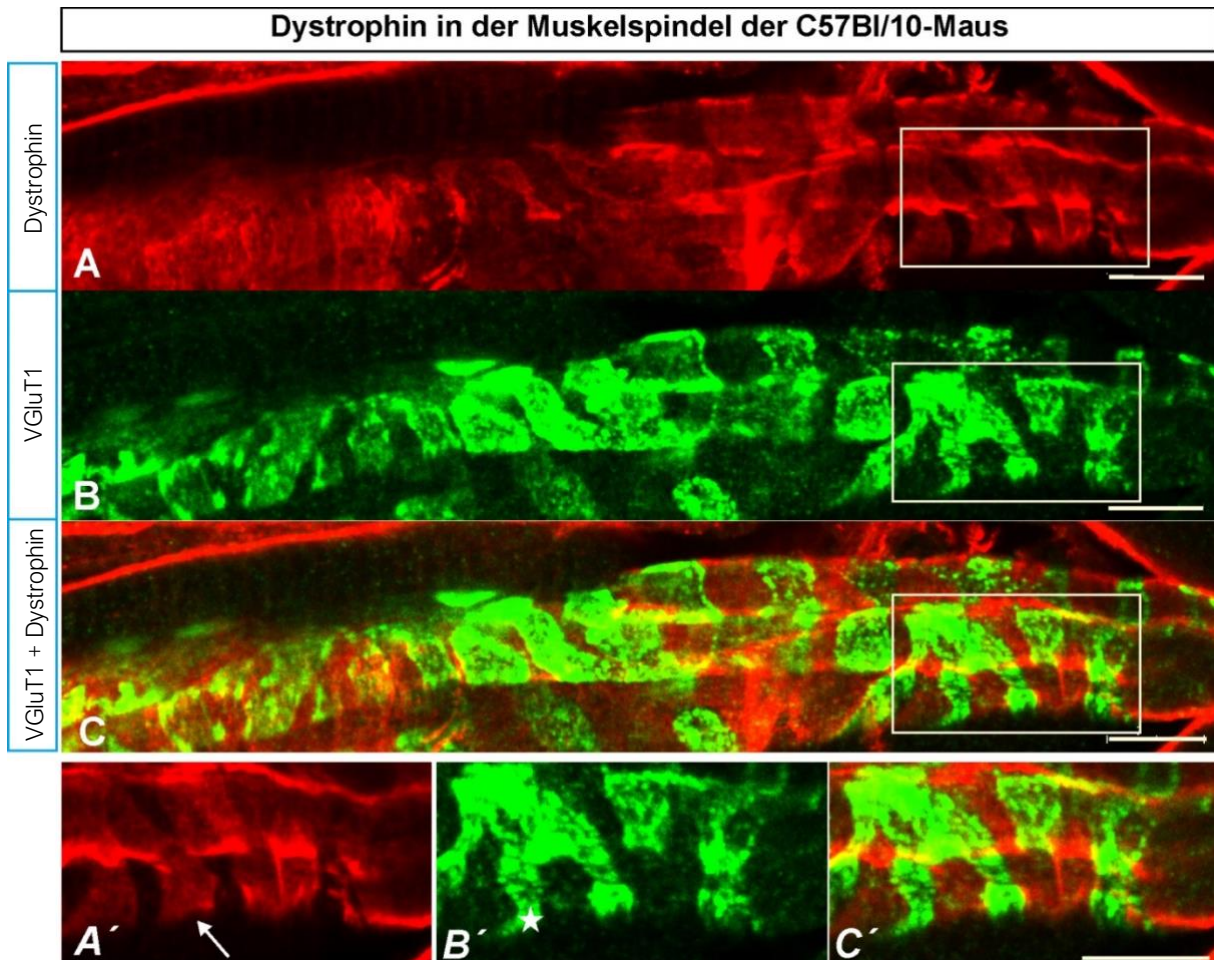


Abbildung 15: Die Lokalisation von Dystrophin in der Muskelspindel der C57Bl/10SnJ-Maus. Dystrophin (rot) und VGluT1 (grün) sind an der Muskelspindel in der wildtyp-Maus am Sarkolemm lokalisiert. Das Dystrophin (Pfeil) zeigt Aussparungen an der Kontaktzone zwischen der sensorischen Nervenendigung und der Intrafusalfaser (Stern). Es ist deutlich zwischen den annulospiralen Endigungen lokalisiert. (Maßstab: 10 μ m)

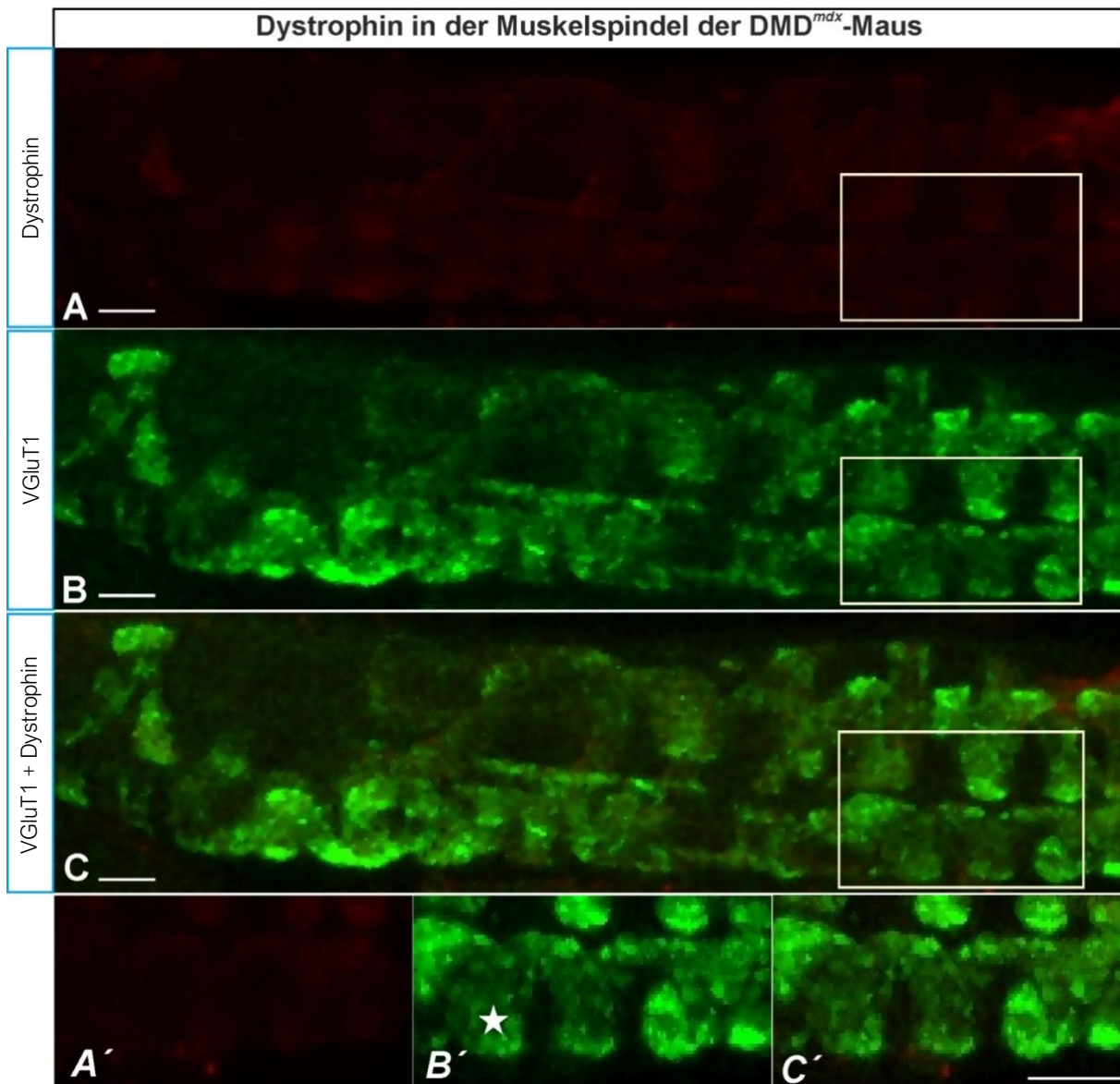


Abbildung 16: Die Lokalisation von Dystrophin in der Muskelspindel der DMD^{mdx}-Maus. In der DMD^{mdx}-Maus fehlt das Dystrophin am Sarkolemm der Intrafusalfasern in der Muskelspindel. VGluT1 (grün) färbt die typischen annulospiralen Endigungen der sensorischen Afferenz. (Maßstab: 10 μ m)

5.2.2 Die Lokalisation von β -Dystroglykan in der Muskelspindel

Während die Expression von β -Dystroglykan an den Neuromuskulären Endplatten bereits häufig beschrieben wurde (siehe zum Beispiel: Ohlendieck et al., 1991), ist die Verteilung von β -DAG innerhalb der Muskelspindel noch unbekannt. Deshalb wurden Muskelspindeln mit Antikörpern gegen β -DAG gefärbt. Wie in Abbildung 17 und 18 gezeigt, ist β -Dystroglykan am Sarkolemm der intrafusalen Fasern in der C57Bl/6 und der C57Bl/10SnJ konzentriert. Dort ist es wie Dystrophin im Bereich zwischen den Kontaktstellen von Intrafusalfaser und sensorischer Nervenendigung aggregiert. Interessanterweise gibt es nur geringe Unterschiede in der strukturellen Anordnung von β -DAG in den drei Mauslinien. Hervorzuheben ist die geringere Intensität der Färbung von β -DAG im zentralen Bereich von Muskelspindeln in der DMD^{mdx}-Maus (Abbildung 19).

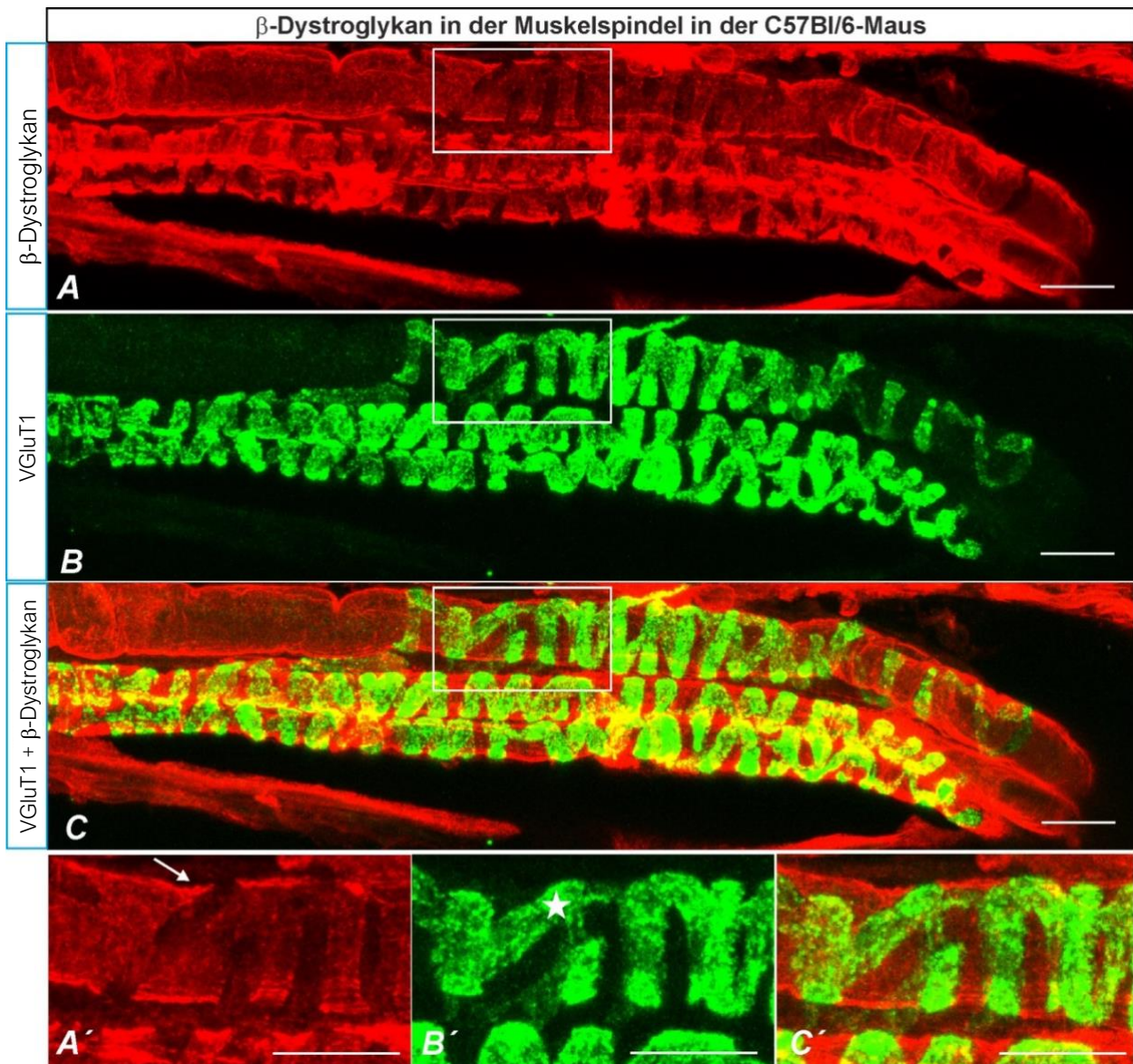


Abbildung 17: Beta-Dystroglykan in der Muskelspindel der C57Bl/6-Maus. Beta-Dystroglykan (Pfeil) ist in rot dargestellt. VGlut1 (grün) markiert die annulospiralen Endigungen der sensorischen Afferenzen an den intrafasalen Fasern (Stern). Beta-Dystroglykan ist wie das Dystrophin zwischen den annulospiralen Endigungen lokalisiert. (Maßstab: 10 μ m)

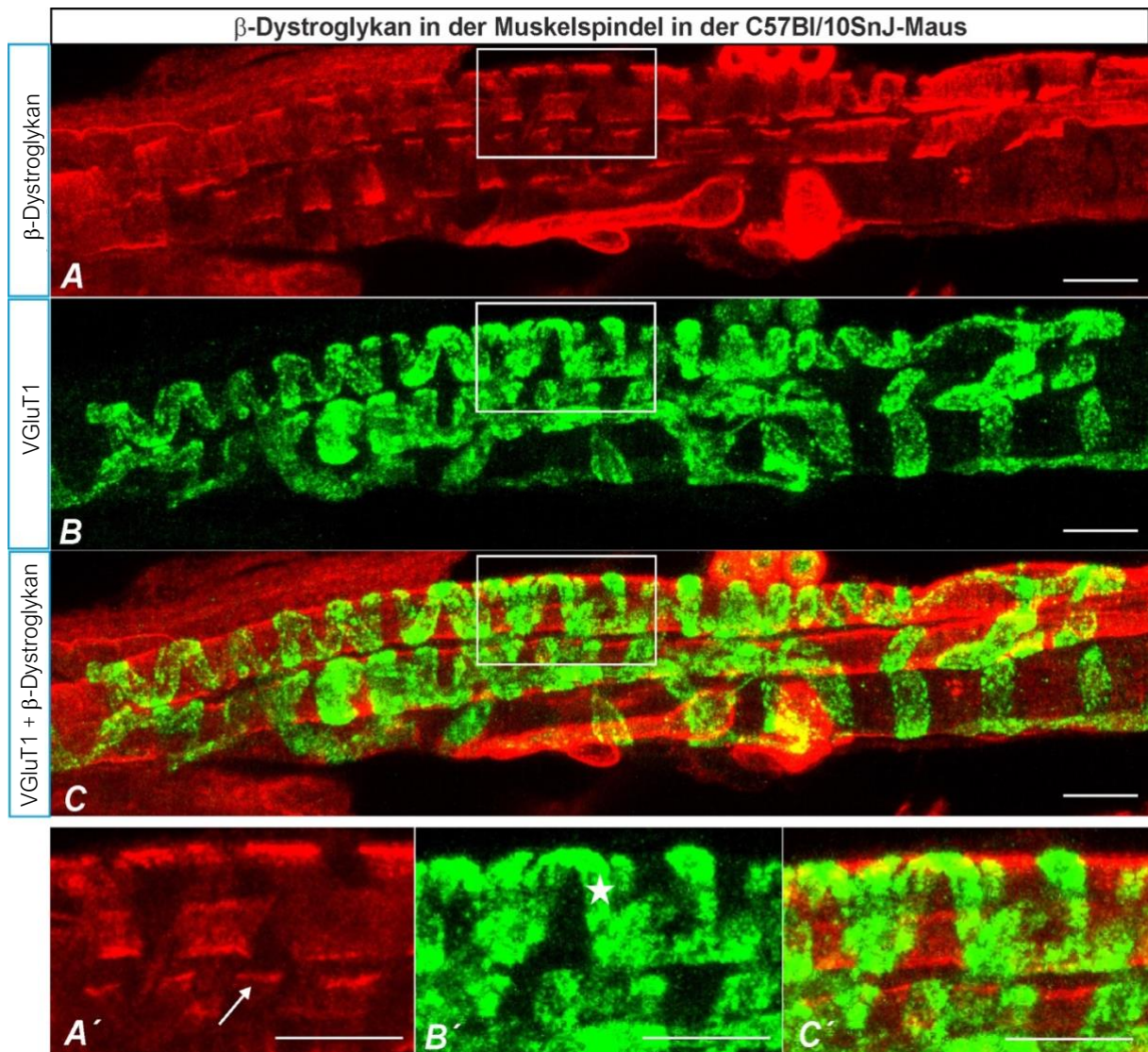


Abbildung 18: Beta-Dystroglykan in der Muskelspindel der C57Bl/10SnJ-Maus. Das β -Dystroglykan (rot) zeigt in der C57Bl/10SnJ-Maus das gleiche Farbverhalten, welches auch in der C57Bl/6-Maus zu beobachten ist: Zwischen den annulospiralen Endigungen konzentriert sich das Protein am Sarkolemm. VGlut1 (Stern) ist in grün dargestellt. (Maßstab: 10 μ m)

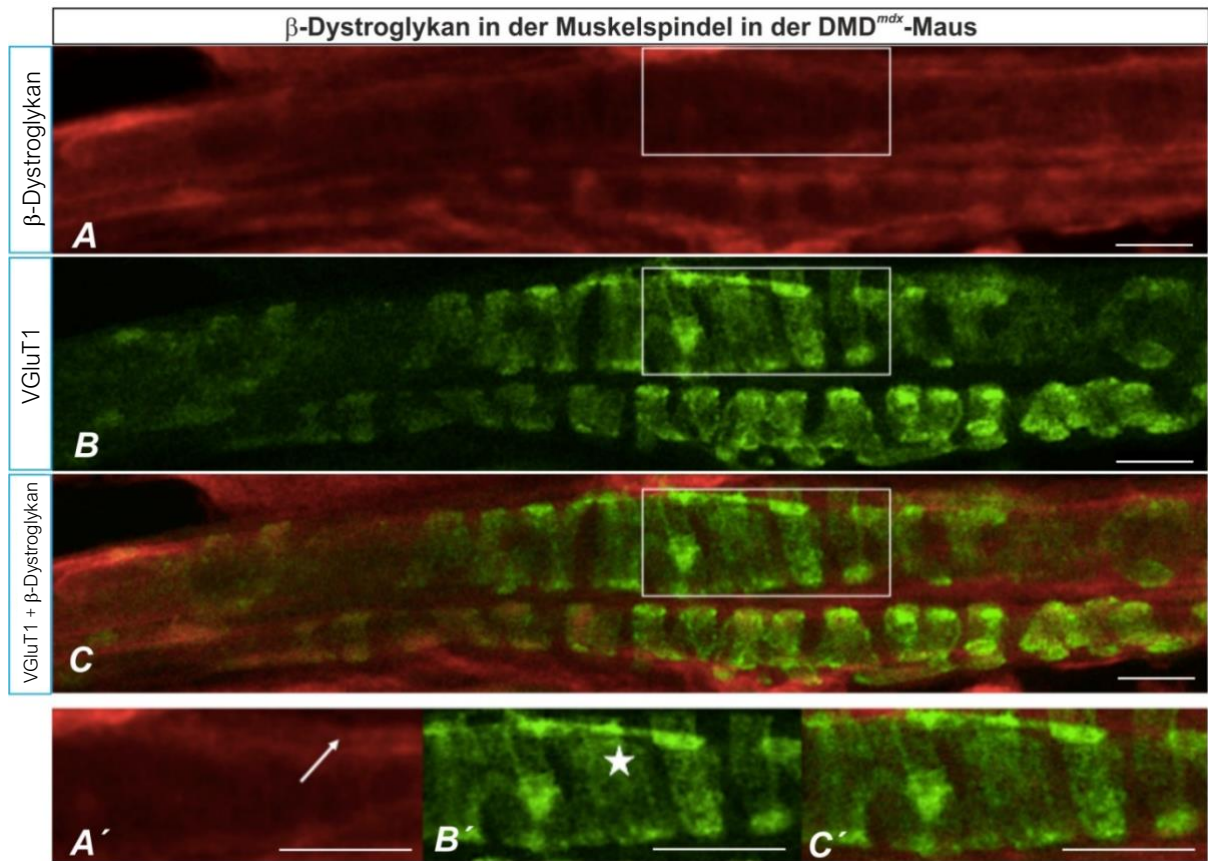


Abbildung 19: Beta-Dystroglykan in der Muskelspindel der DMD^{mdx}-Maus: In der DMD^{mdx}-Maus ist das β -Dystroglykan (rot, Pfeil) am Sarkolemm der Intrafusalen Faser in einer geringeren Intensität vorhanden. Typische Aussparungen an den Kontaktbereichen der annulospiralen Endigungen sind nicht zu erkennen. Es zeigen sich kaum Unterschiede in der Lokalisation am Sarkolemm und an der Kontaktzone der annulospiralen Endigungen. VGluT1 markiert die sensorischen Nervenendigungen in grün (Stern). (Maßstab: 10 μ m)

5.2.3 Die Lokalisation von Utrophin in der Muskelspindel

Die Verteilung von Utrophin innerhalb der Extrafusalfasern wurde bereits in zahlreichen Studien beschrieben (Helliwell et al., 1992; Pons et al., 1993). Über die Verteilung von Utrophin innerhalb der Intrafusalfaser war jedoch bisher nichts bekannt und wird hier erstmals beschrieben. In den immunhistochemischen Färbungen der wildtyp-Muskelspindeln ist Utrophin am Sarkolemm nicht nachweisbar. Ebenso werden die Kontaktbereiche der sensorischen Nervenendigungen nicht von Utrophin flankiert, wie es bei β -Dystroglykan und Dystrophin der Fall war. Die Frage, ob in der Muskelspindel der DMD^{mdx}-Mäuse eine Hochregulierung von Utrophin stattfindet, lässt sich anhand Abbildung 22 beantworten: Im Gegensatz zu den wildtyp-Mäusen ist Utrophin in Spindeln der DMD^{mdx}-Maus in den Bereichen des Sarkolemm konzentriert, die nicht mit den sensorischen Afferenzen in Kontakt stehen. Dieses Verteilungsmuster innerhalb der intrafusalen Fasern deckt sich mit der Verteilung von Dystrophin in den wildtyp-Mäusen.

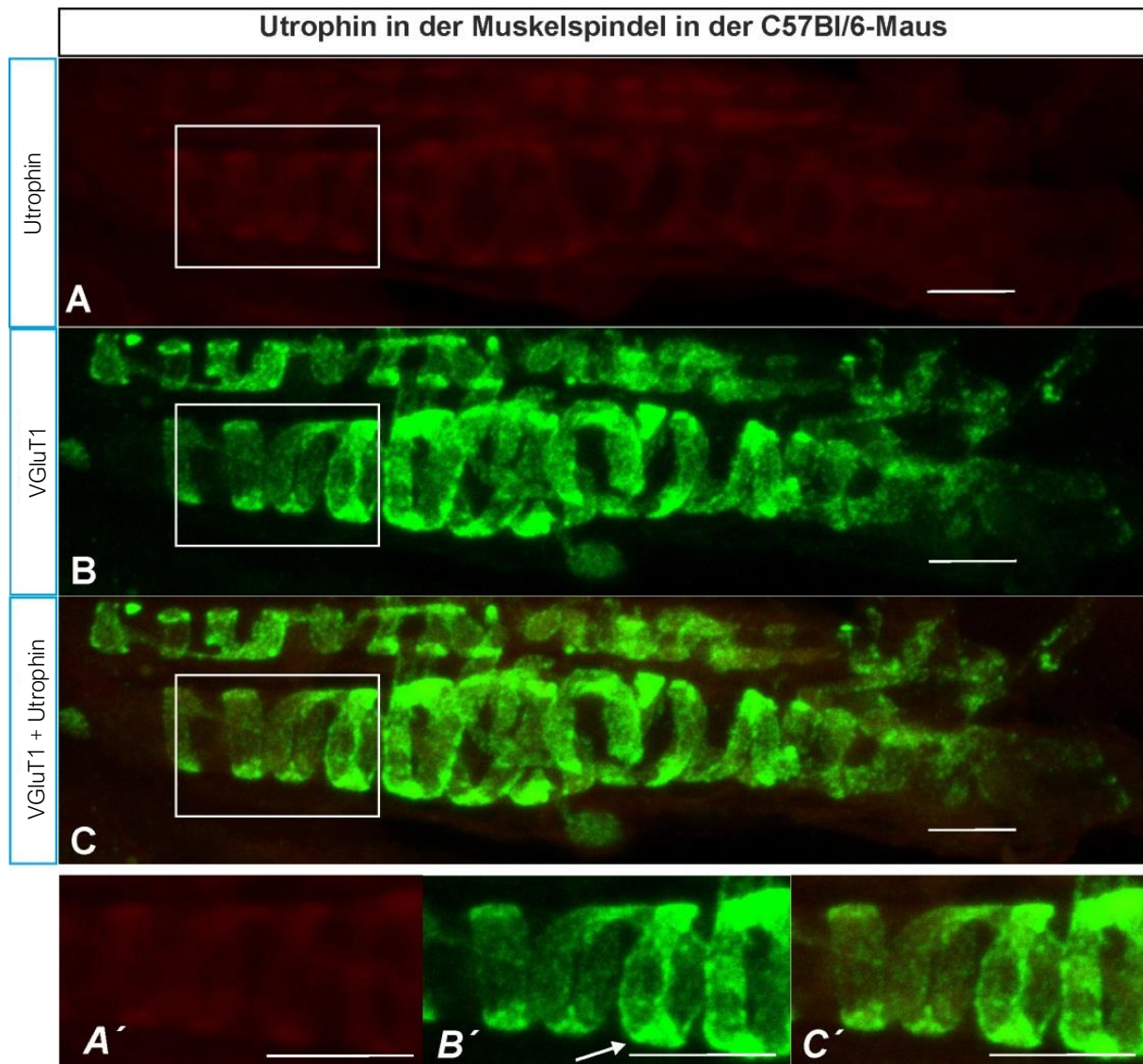


Abbildung 20: Utrophin in der Muskelspindel in der C57Bl/6-Maus. Die Abbildung zeigt eine Muskelspindel aus dem M. soleus der C57Bl/6-Maus. Utrophin zeigt weder am Sarkolemm, noch innerhalb der intrafusalen Faser eine Anfärbung. VGluT1 (Pfeil) markiert die sensorischen Nervenendigungen in grün. (Maßstab: 10 μ m)

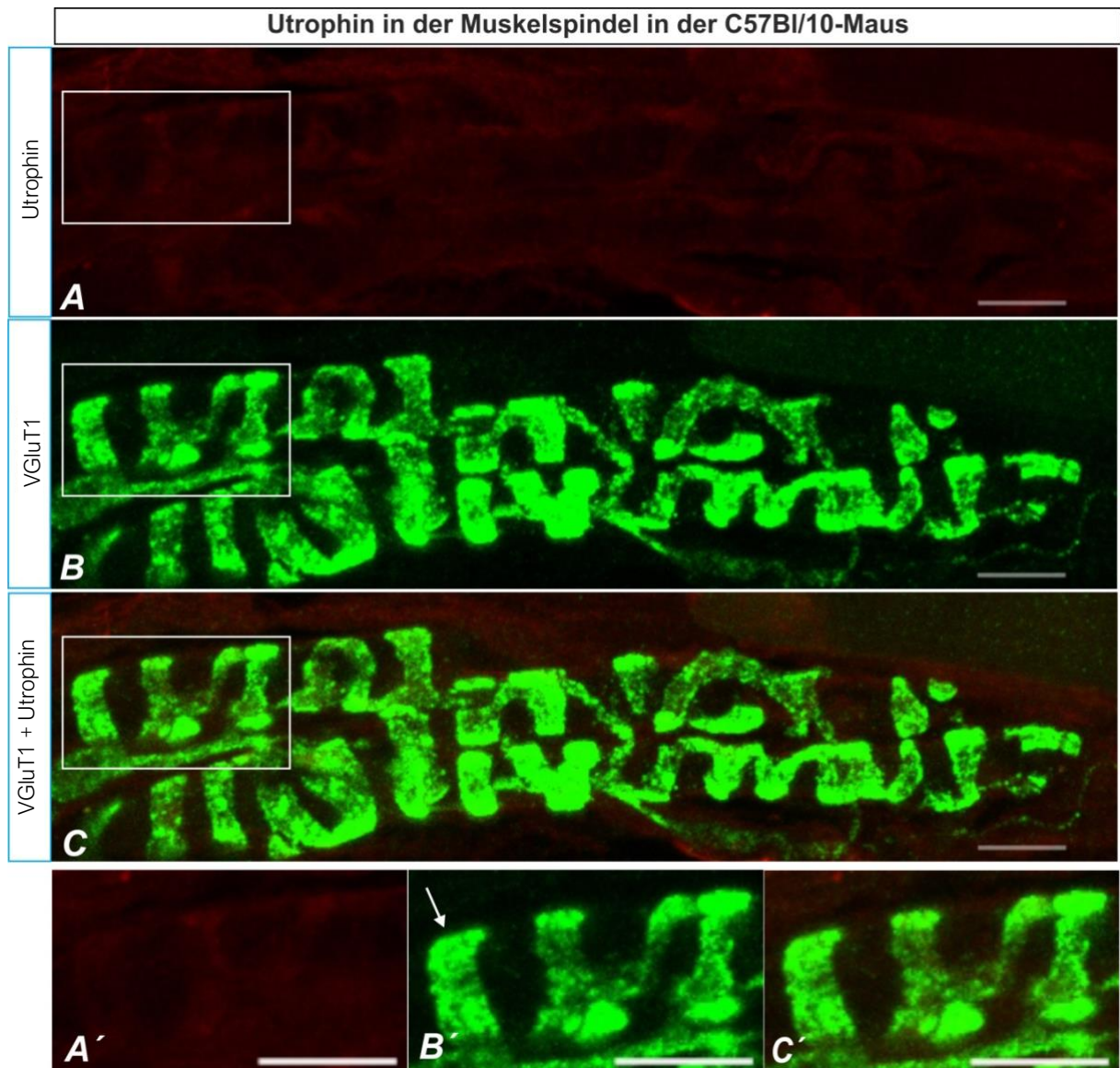


Abbildung 21: Utrophin in der Muskelspindel der C57Bl/10SnJ-Maus. Die Abbildung zeigt eine Muskelspindel aus dem M. soleus der C57Bl/10SnJ-Maus. Utrophin ist mit einem rot-fluoreszierenden Zweitantikörper markiert und zeigt weder am Sarkolemm noch innerhalb der intrafusalen Faser eine Färbung. VGluT1 markiert die sensorischen Nervenendigungen in grün (Pfeil). (Maßstab: 10 μ m)

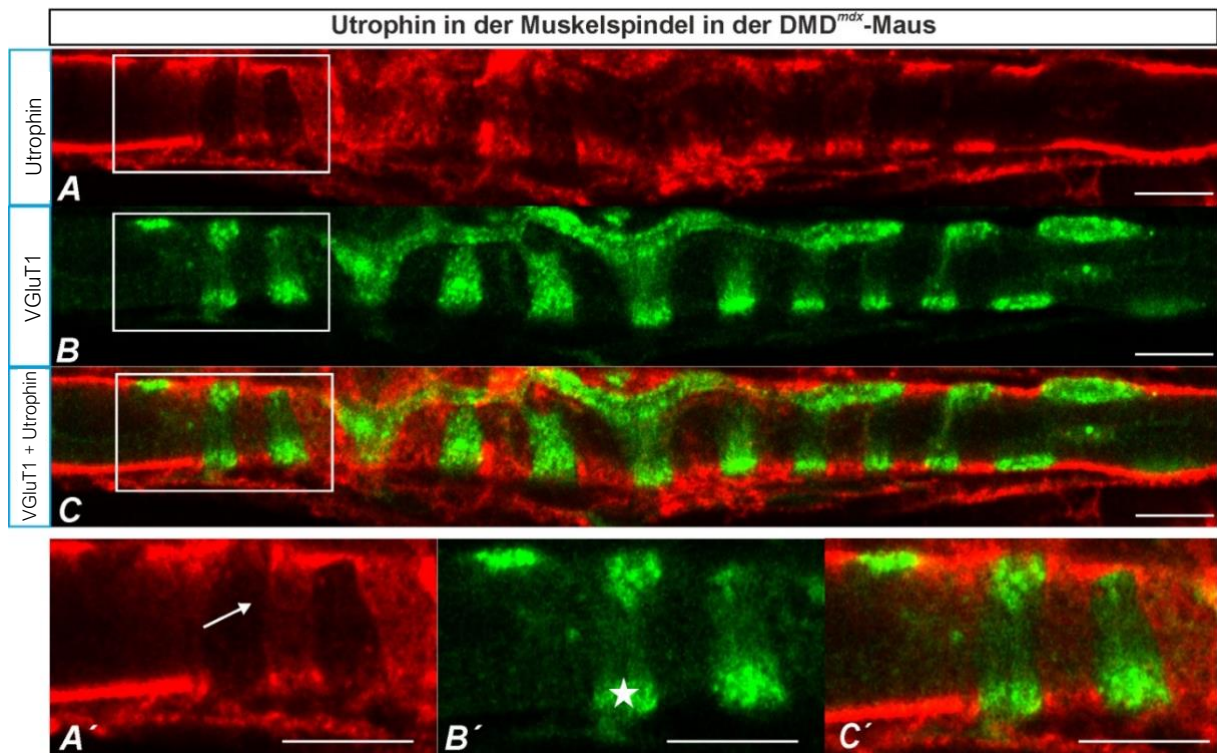


Abbildung 22: Utrophin in der Muskelspindel der DMD^{mdx}-Maus. Die präsynaptischen Nervenendigungen wurden mit Antikörper gegen den vesikulären Glutamatttransporter vom Typ 1 immunhistochemisch markiert (grün). In der DMD^{mdx}-Maus ist Utrophin (rot, Pfeil) alternierend zwischen den annulospiralen Endigungen (Stern) zu erkennen. Im Bereich der sensorischen Endigungen ist das Utrophin ausgespart. (Maßstab: 10 μ m)

Die Abbildungen 23 und 24 fassen schematisch die Lokalisation der DGC-Komponenten in den Muskelspindeln der wildtyp-Maus und der DMD^{mdx}-Maus zusammen. Die Basalmembran (dunkelblau) bedeckt die sensorischen Nervenendigungen, welche die Intrafusalfaser kontaktieren (Maier & Mayne, 1995). Der DGC ist genau in den Bereichen konzentriert, in denen die Intrafusalfasern direkten Kontakt zur Basalmembran haben. Bereiche, in denen die Basalmembran nur die sensorische Nervenendigung kontaktiert, besitzen keinen DGC.

In der wildtyp-Maus war Utrophin am Sarkolemm der Intrafusalfasern nicht nachweisbar. In der DMD^{mdx}-Maus war die Expression von Utrophin hochreguliert und die Verteilung von Utrophin identisch mit der von Dystrophin in den wildtyp-Mäusen. Es kann also vermutet werden, dass Utrophin das fehlende Dystrophin in der DMD^{mdx}-Maus funktionell kompensiert. Die Intensität der Immunreaktivität mit Antikörpern gegen β -Dystroglykan ist in der wildtyp-Maus stärker ausgeprägt als in der DMD^{mdx}-Maus (Abbildung 24). Dystrophin war in der wildtyp-Maus in den Kontaktbereichen zwischen den annulospiralen Endigungen und der Intrafusalfaser ausgespart und in der DMD^{mdx}-Maus nicht zu finden.

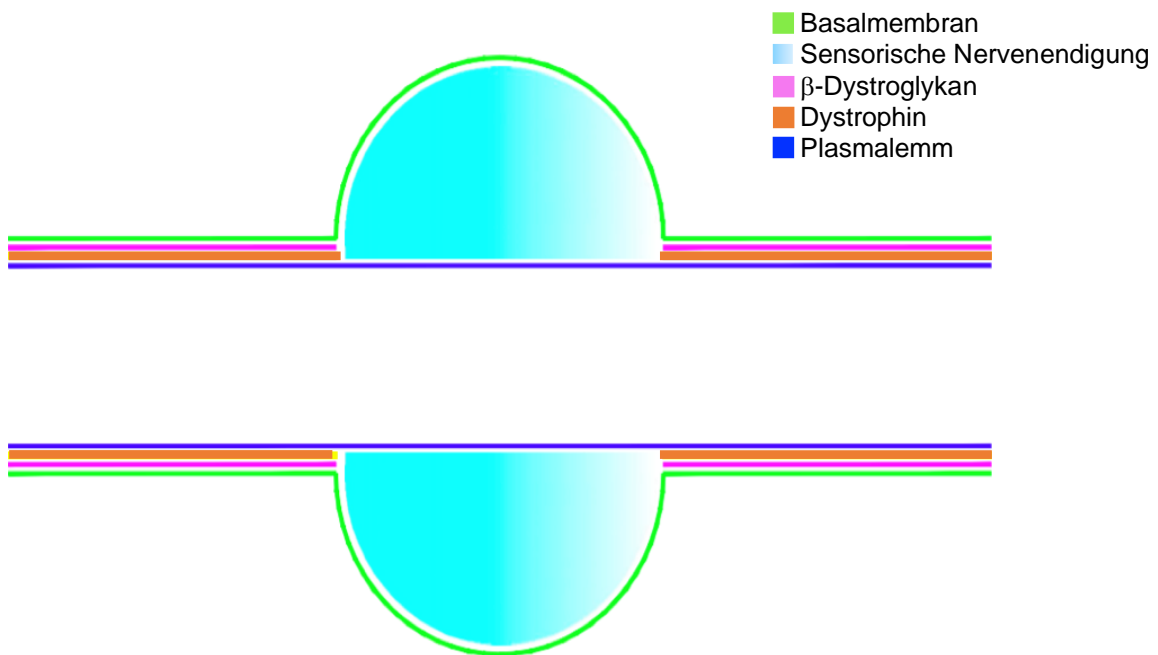


Abbildung 23: Schematische Darstellung einer annulospiralen Endigung an der intrafusalen Muskelfaser im Längsschnitt in der wildtyp-Maus. Die dunkelblaue Linie stellt die Basalmembran dar, welche die sensorische Nervenendigung bedeckt. Die Basalmembran umschließt die intrafusale Faser auch in den Regionen, in welchen keine sensorische Nervenendigung die Faser kontaktiert.

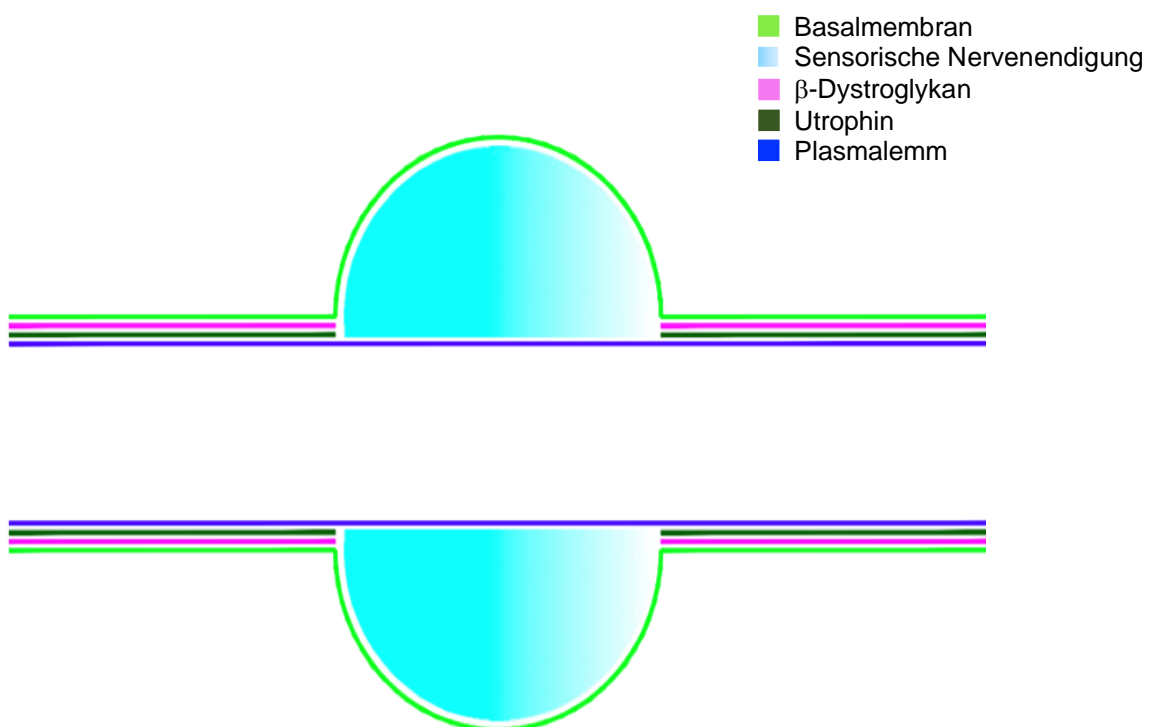


Abbildung 24: Schematische Darstellung einer annulospiralen Endigung an der intrafusalen Muskelfaser im Längsschnitt in der DMD^{mdx}-Maus. Die dunkelblaue Linie stellt die Basalmembran dar, welche die sensorische Nervenendigung bedeckt. Utrophin ist zwischen dem Plasmalemm und dem gering exprimierten β -Dystroglykan zu finden.

5.3 Die Anzahl der Umrundungen der annulospiralen Endigungen

Um zu analysieren, ob sich die Morphologie der annulospiralen Endigungen an der Intrafusalfaser zwischen der DMD^{mdx}-Maus und den wildtyp-Mauslinien unterscheidet, wurde die Struktur der zirkumferentiellen Elemente der sensorischen Nervenendigungen im zentralen Bereich von Muskelspindeln quantitativ untersucht. In der C57Bl/6-Maus zeigen sich minimal sechs bis maximal zehn Umrundungen auf einer Länge von 50 µm. In der C57Bl/10SnJ-Maus werden Höchstwerte von neun Umrundungen und vergleichsweise niedrigere Werte von fünf Umrundungen pro 50 µm beobachtet. Die zirkulären Umrundungen an der Intrafusalfaser durch die sensorische Afferenz in der DMD^{mdx}-Maus zeigen sich im Schnitt im Mittelfeld. Höchstwerte von neun Umrundungen und Mindestwerte von sieben Umrundungen wurden festgehalten. Statistischen Berechnungen, die anhand der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) berechnet worden sind, ist der Unterschied zwischen den drei Mauslinien nicht signifikant. Die Mittelwerte der Umrundungen der annulospiralen Endigungen pro 50 µm in der C57Bl/6-, der C57Bl/10SnJ- und der DMD^{mdx}-Maus sind in der Abbildung 25 gezeigt.

Diese Daten stützen die Hypothese, dass eine eingeschränkte Propriozeption in der DMD^{mdx}-Maus sich nicht auf eine veränderte Anzahl der zirkumferentiellen Elemente der sensorischen Endigungen zurückführen lässt.

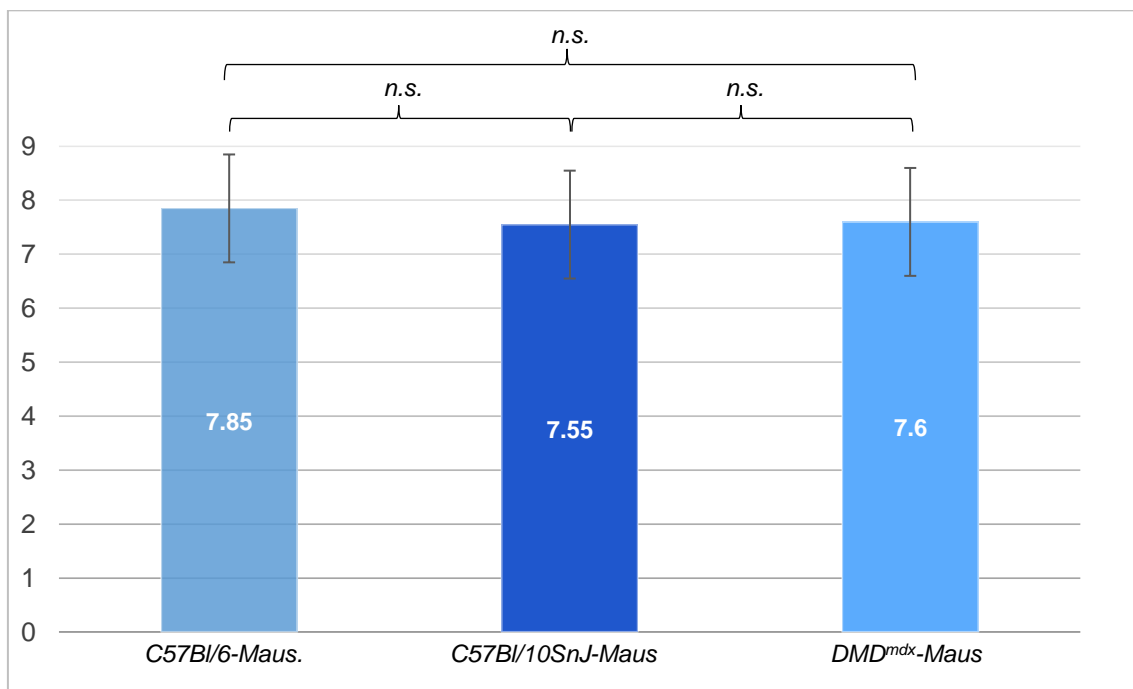


Abbildung 25: Anzahl der Umrundungen pro 50 µm der annulospiralen Endigungen. Die Balken stellen die Mittelwerte plus Standardabweichungen der Anzahl der Umrundungen der annulospiralen Endigungen dar. N=3.

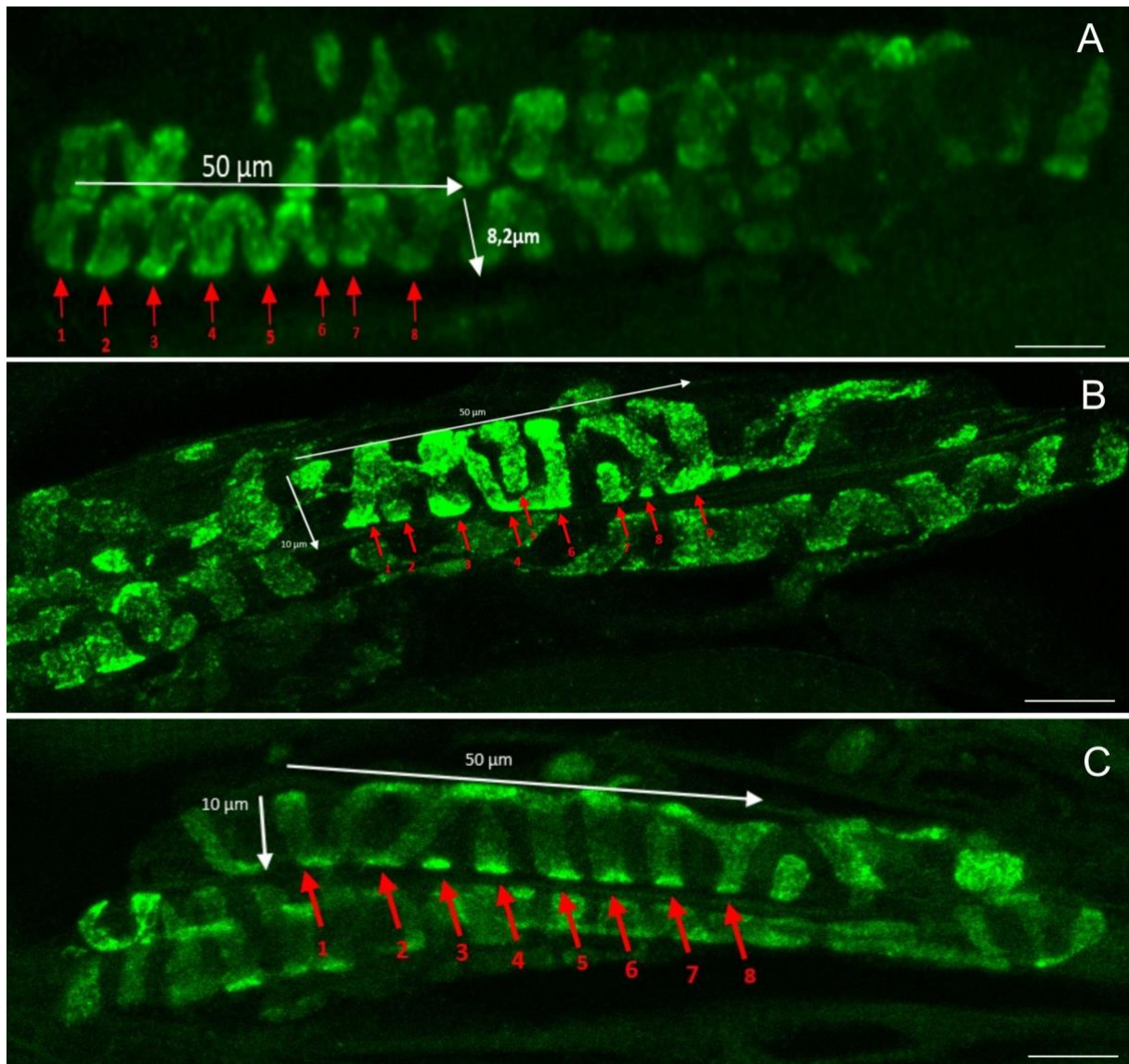


Abbildung 26: Anzahl der Umrundungen am Beispiel der C57Bl/6-, der C57Bl/10SnJ- und der DMD^{mdx}-Maus. A, B und C stellen die Morphologie dreier Muskelspindeln aus der C57Bl/6-Maus (A), der C57Bl/10SnJ-Maus (B) und der DMD^{mdx}-Maus (C) dar. Mithilfe der Antikörper gegen VGLuT1 können die annulospiralen Endigungen dargestellt werden (grün). Die weißen Pfeile dienen der Begrenzung des definierten Durchmessers von 8-10 µm und der vorbestimmten Länge der intrafusalen Fasern von 50 µm. Mithilfe der roten Pfeile ist exemplarisch jede Umrundung der sensorischen Afferenz nach 360 Grad gekennzeichnet. (Maßstab: 10 µm)

5.4 Quantitative Bestimmung der Anzahl von Muskelspindeln

Um zu untersuchen, ob es neben der Degeneration der Extrafusalfasern auch zu einer Degeneration von Muskelspindeln kommt, wurde die Anzahl der Muskelspindeln pro Soleusmuskel bei den wildtyp-Stämmen und der DMD^{mdx}-Maus bestimmt. Die Frage sollte die Hypothese klären, ob eine Reduktion der Muskelspindeldichte eine mögliche Ursache für die hohe Fallneigung bei Muskeldystrophie Duchenne Patienten ist. Diese Hypothese, wurde bereits im Jahr 1894 von Sherrington aufgestellt (Sherrington, 1894). Zahlreiche Analysen der Anzahl von Muskelspindeln in verschiedenen Muskeln innerhalb einer oder mehrerer Spezies folgten (Banks, 2006). Werden die Mittelwerte der Spindelanzahl in einem M. soleus der C57Bl/6-Maus (10,33), der C57Bl/10SnJ-Maus (9) und der DMD^{mdx}-Maus (10,33) betrachtet, sind diese Unterschiede nicht signifikant (Abbildung 26). Die Abbildung 27 zeigt eine Übersichtsaufnahme eines M. soleus einer wildtyp-Maus. In Abbildung 28 sind die Muskelspindeln der Muskeln skizziert.

Mit diesen Ergebnissen kann gezeigt werden, dass keine Disparität in der Anzahl der Muskelspindeln zwischen den dystrophischen DMD^{mdx}-Mäusen und den zwei exemplarischen wildtyp-Stämmen besteht. Es kommt also zu keinem Nettoverlust von Muskelspindeln in der DMD^{mdx} Maus. Die beeinträchtigte Propriozeption der Patienten mit Muskeldystrophie Duchenne kann im Mausmodell somit nicht mit einer veränderten Anzahl von Muskelspindeln erklärt werden.

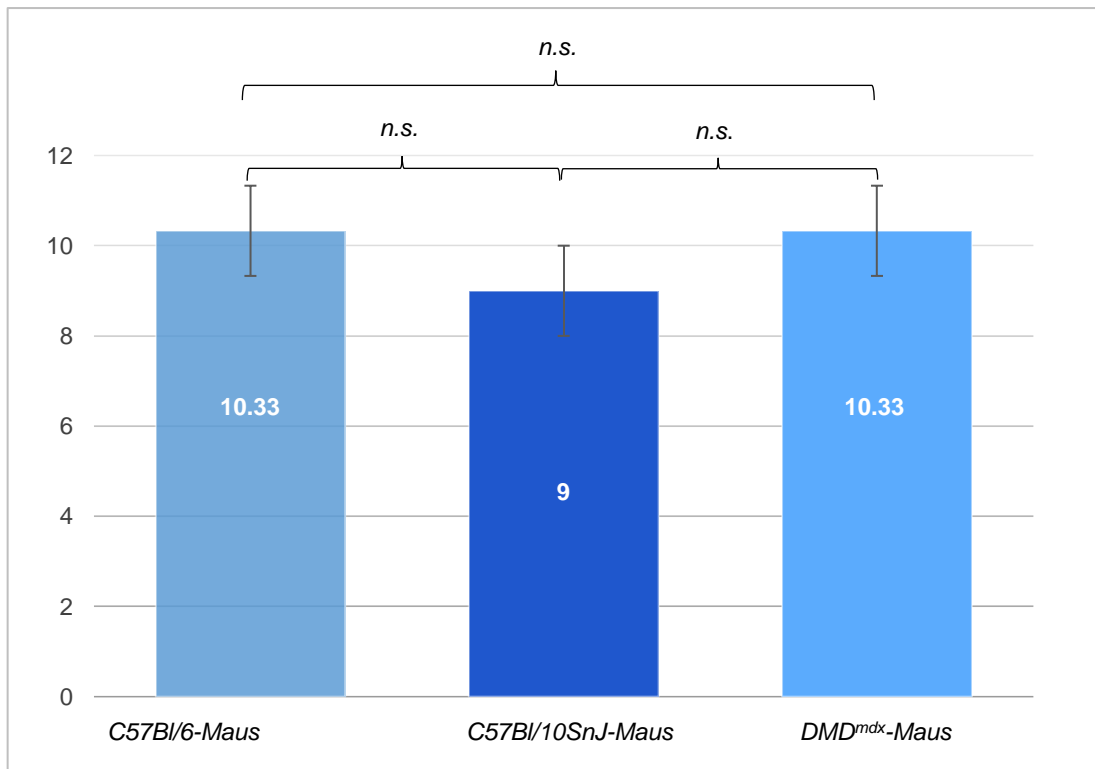


Abbildung 27: Anzahl der Muskelspindeln in der C57Bl/6-, der C57Bl/10SnJ- und in der DMD^{mdx}-Maus. Die Balken stellen die Mittelwerte plus Standardabweichungen der Anzahl der Muskelspindeln in den Mauslinien dar. N=3.

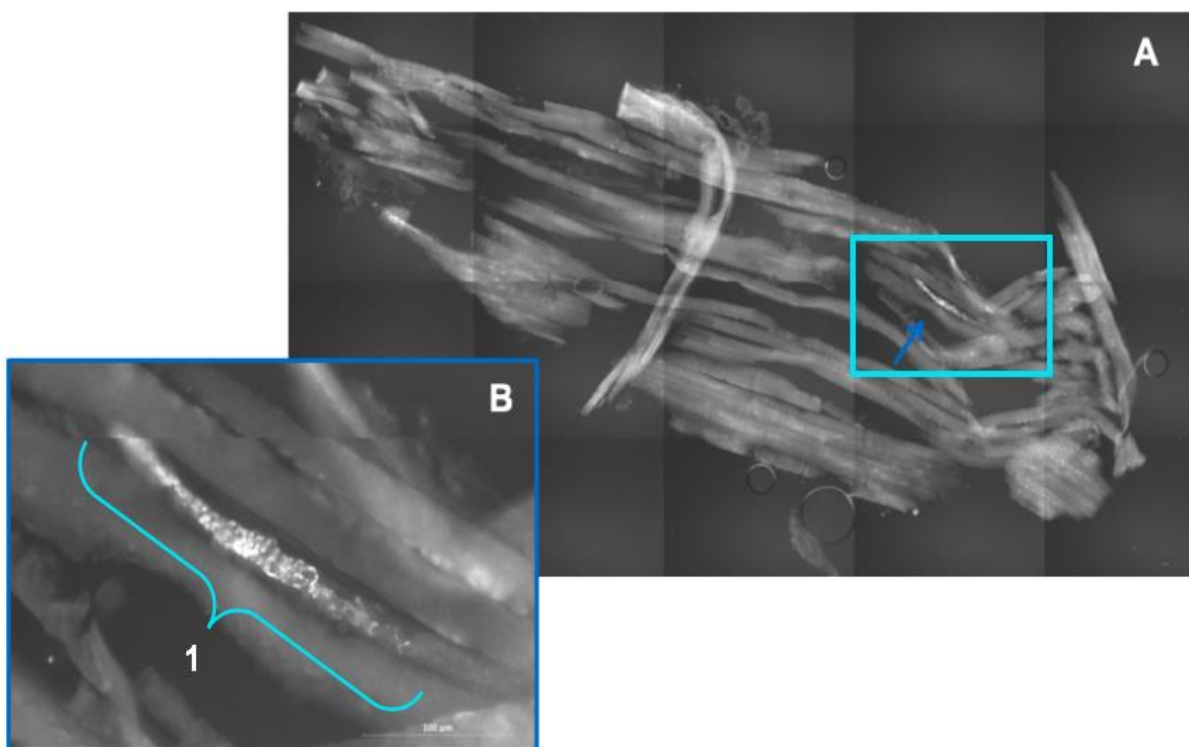


Abbildung 28: Darstellung einer Übersichtsaufnahme des M. Soleus der C57Bl/6-Maus.

A zeigt einen Gewebeschnitt des M. Soleus einer wildtyp-Maus von der C57Bl/6 Linie. Insgesamt wurden 20 Aufnahmen mit dem Epifluoreszenzmikroskop gemacht und als ganzer Muskelquerschnitt dargestellt.

B: Die Nahaufnahme der Muskelspindel (1) zeigt die typischen morphologischen Kennzeichen. VGLUT1 ist im Farred Kanal dargestellt. Die anderen Kanäle sind für eine bessere Übersicht nicht gezeigt.

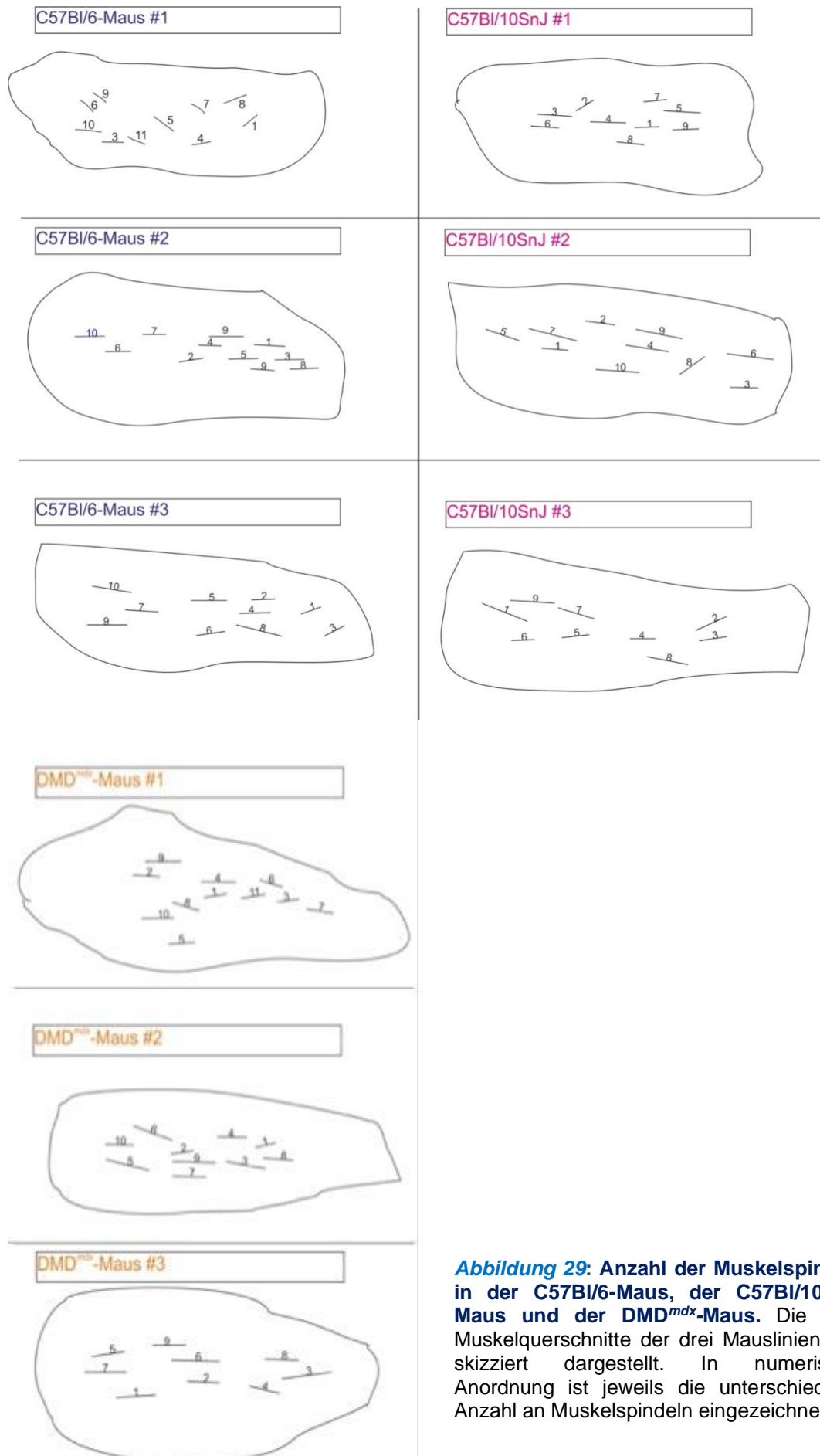


Abbildung 29: Anzahl der Muskelspindeln in der C57Bl/6-Maus, der C57Bl/10SnJ-Maus und der DMD^{mdx}-Maus. Die neun Muskelquerschnitte der drei Mauslinien sind skizziert dargestellt. In numerischer Anordnung ist jeweils die unterschiedliche Anzahl an Muskelspindeln eingezeichnet.

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Muskelspindeln von DMD^{mdx}-Mäusen molekular und strukturell verändert sind. Unter anderem wurde erstmals die Verteilung von Utrophin, Dystrophin sowie β -Dystroglykan in der DMD^{mdx}-Maus beschrieben. Die Untersuchungen zeigen, dass der DGC eine ähnliche Zusammensetzung und Verteilung am Sarkolemm der Intrafusalfasern wie in den Extrafusalfasern hat. Strukturelle Veränderungen wurden nicht gefunden, aber eine Veränderung der Expression von Utrophin in DMD^{mdx}-Mäusen konnte gezeigt werden.

Neben den durch die Degeneration der Skelettmuskulatur ausgelösten Symptomen wie die Muskelschwäche und Atem- bzw. Schluckproblemen sind bei den Patienten eine erhöhte Fallneigung und Gangunsicherheit festzustellen. Diese Gangabnormalität äußert sich besonders in einer Instabilität während der Belastungsantwort, der mittleren Standphase sowie an deren Ende (Hsu & Furumasa, 1993).

Ein wesentlicher Teil der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob defekte Muskelspindeln diese Gang- und Standunsicherheit mit verursachen könnten. Eine Möglichkeit wäre, dass die DMD^{mdx}-Maus strukturelle Veränderungen aufweist, von denen man prognostizieren könnte, dass sie funktionelle Einschränkungen von Muskelspindeln verursachen. Der bisherige Kenntnisstand über die Morphologie sowie die funktionellen Auffälligkeiten von Muskelspindeln bei Muskeldystrophie Duchenne Patienten wird deshalb im Folgenden diskutiert:

Im Jahre 1976 wurde erstmals die Struktur von Muskelspindeln an postmortalem Gewebe von DMD Patienten untersucht (Swash & Fox, 1976). Swash und Fox entnahmen Autopsieproben von insgesamt 68 Muskeln aus sieben Muskeldystrophie Duchenne Patienten deren Alter zwischen 15 und 17 Jahren lag. Sie beschrieben eine verdickte Bindegewebskapsel und eine Vergrößerung des periaxialen Raumes. Eine vermehrte Kollagensekretion und eine Vervielfältigung der Lamellen, welche die Kapselverdickung vermutlich begünstigen, wurden beobachtet. Die Intrafusalfasern waren in diesen Untersuchungen im Vergleich zu den Extrafusalfasern kaum von degenerativen Prozessen betroffen. Allerdings musste, wie bei allen postmortalen Untersuchungen, ungeklärt bleiben, ob diese degenerativen Prozesse kausal mit

der Mutation zusammenhängen oder sekundär durch die bereits kurz nach dem Exitus einsetzenden autolytischen Prozesse bzw. den langen Krankheitsverlauf und die Immobilität evoziert wurden.

Eine ähnliche Beobachtung hinsichtlich der Morphologie der Intrafusalfasern machten auch Skuk et al. (2010) an einem einzelnen 37-jährigen Patienten. Während im Biopsiematerial vom M. biceps brachii die Extrafusalfasern komplett degeneriert waren, waren die Intrafusalfasern kaum betroffen. Die Muskelspindeln hatten eine normale Spindelgröße, einen normalen Durchmesser der Intrafusalfasern und eine normale Dicke der Kapsel (Skuk et al., 2010). In diesem Biopsiematerial wurde keine Dystrophin und keine Utrophin Immunreaktivität festgestellt. Im DMD Patienten wird die Utrophinexpression im Gegensatz zu den DMD^{mdx}-Mäusen nicht hochreguliert.

Kararizou et al. konnten im Unterschied zu den Untersuchungen von Skuk et al. (2010) sowie Swash und Fox (1976) geringe Veränderungen in den Muskelspindeln von DMD und BMD Patienten feststellen. Diese Veränderungen äußerten sich in einem reduzierten Durchmesser von Intrafusalfasern, einer verdickten Bindegewebskapsel und einer Erhöhung der Zellkernanzahl in den Intrafusalfasern (Kararizou et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden alle 20 Muskelspindeln der DMD^{mdx}-Maus auf mögliche degenerative Prozesse untersucht, um herauszufinden ob Intrafusalfasern ähnlich wie die Extrafusalfasern betroffen sind. Dazu wurden die Intrafusalfasern auf Kaliberschwankungen und Zellkernzentralisierungen untersucht. Trotz des Fehlens von Dystrophin zeigten diese kaum Zeichen einer Degeneration. Warum scheinen die Intrafusalen Fasern resistenter als extrafusale Fasern gegenüber degenerativen Prozessen zu sein?

Die Verdickung der Muskelspindelkapsel in der äquatorialen Region könnte als Adaptationsprozess fungieren und einen Schutz für die intrafusalen Fasern bieten.

In Anlehnung an bereits beschriebene Vorgänge bei extraokulären Muskeln (Khurana et al. 1995) könnte auch in den intrafusalen Fasern eine bessere Regulation der intrazellulären Calcium Hämostase zum Erhalt dienen.

Zudem machen sie der kleinere Durchmesser und die geringere mechanische Belastung vermutlich weniger anfällig für Schäden in der Membran und damit für eine sarkolemmale Degeneration.

Die vorliegende Arbeit macht eine weitere Erklärung für die verminderte Degeneration der Intrafusalfasern möglich, nämlich die kompensatorische Hochregulierung von Utrophin. Beim Menschen ist kein Utrophin in der Extrafusalfaser zu finden. Möglicherweise fehlt das Homolog zu Dystrophin auch in den Intrafusalfasern der Muskelspindeln und könnte so die beobachteten Anzeichen (siehe Kararizou et al. 2007), einer Degeneration begründen. Die Morphologie der Intrafusalfasern bei DMD Patienten bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

Weiterhin besteht die Frage, ob Muskelspindeln bei Patienten mit Muskeldystrophie Duchenne in ihrer Funktion beeinträchtigt sind. Darauf geben Untersuchungen von Yiu und Kornberg Hinweise, die Auffälligkeiten in der Reflexantwort bei DMD Patienten feststellten (Yiu & Kornberg, 2015). Als Kritikpunkt anzumerken ist hier jedoch, dass die Propriozeption alleine an der Reflexantwort gemessen wurde. Es ist nicht ersichtlich, ob die Beeinträchtigung der Reflexantwort den Intrafusalfasern, den Extrafusalfasern oder der sensorischen Innervation von Muskelspindeln zuzuordnen ist.

Weitere funktionelle Erkenntnisse über dystrophische Muskelspindeln lieferten Ribot-Ciscar et al. indem sie an 20 Patienten mit Muskeldystrophie die Propriozeption anhand der Wahrnehmung von passiven und illusorischen Bewegungen analysierten. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zur gesunden Kontrollgruppe feststellen (Ribot-Ciscar et al., 2004). Da nur vier Patienten mit Muskeldystrophie Duchenne oder Muskeldystrophie vom Typ Becker untersucht wurden, ist die Signifikanz der Aussagen über eine Beeinträchtigung der Propriozeption in der DMD erschwert. Zudem ist unklar, inwiefern eine zentrale Kompensation eine beeinträchtigte Muskelspindelfunktion ausgleichen kann.

Aimonetti et al. beschäftigten sich ebenfalls mit dem Einfluss der Muskeldystrophien auf die Funktion der Intrafusalfasern (Aimonetti et al., 2005). Dabei wurde die Auswirkung von Untersuchungsmanövern, welche die Muskelspindelsensitivität und deren Reflexantwort erhöhen (z.B. Jendrassik-Handgriff), analysiert. Die Muskeldystrophie Patienten sowie die gesunde Kontrollgruppe zeigten keine Unterschiede in ihrer Reflexantwort. Aimonetti et al. vermuteten daher eine unbeeinträchtigte Kontraktionsfähigkeit der Intrafusalfasern von Muskelspindeln in dystrophischem Gewebe. Untersucht

wurden bevorzugt Muskelspindeln bei Kindern und bei Patienten mit langsam voranschreitenden progressiven Muskeldystrophien. Aus den Untersuchungen wird nicht klar, warum Intra- und Extradusalfasern unterschiedlich stark von der Erkrankung beeinflusst werden.

Neueste Erkenntnisse in der Frage, ob funktionelle Veränderungen in Muskelspindeln für die Gangunsicherheit und die erhöhte Fallneigung ursächlich sind, liefert die Arbeit von Gerwin (2020): In funktionalen Analysen wurden sensorische Afferenzen von Muskelspindeln im M. Extensor digitorum longus der DMD^{mdx}-Maus untersucht. Extrazelluläre Ableitungen von einzelnen Muskelspindeln aus dystrophischen Mäusen zeigten im Vergleich zu Muskelspindeln von wildtyp Mäusen eine signifikante Erhöhung der Ruhefrequenz. Diese Veränderungen könnten über den monosynaptischen Muskel-Dehnungs-Reflex eine erhöhte Muskelsteifigkeit und damit zu einer erhöhten Degeneration von extrafusalen Fasern bei DMD Patienten führen (Gerwin 2020).

Bei der Auseinandersetzung mit den bisherigen Publikationen wird ersichtlich, dass sowohl über die Funktion als auch über die Morphologie von Muskelspindeln bei DMD Patienten wenig bekannt ist und die Publikationen in ihren Aussagen voneinander abweichen (Vergleiche zum Beispiel: Kararizou et al., 2007 und Skuk et al., 2010). Insbesondere über die Zusammensetzung des DGCs in Intradusalfasern ist noch wenig bekannt. Im Folgenden möchte ich deswegen meine Ergebnisse diskutieren, sie in Zusammenhang mit früheren Publikationen stellen und die Limitierungen meiner Methoden ansprechen.

6.1 Die Komponenten des Dystrophin-assoziierten-Glykoproteinkomplexes in der Muskelspindel

Eine wesentliche Frage, die in dieser Arbeit untersucht werden sollte, war die Lokalisation des DGCs in Muskelspindeln. Benutzt habe ich dafür Antikörper gegen Dystrophin und β -Dystroglykan. Untersucht wurden Muskelspindeln aus wildtyp- und DMD^{mdx}-Mäusen. Beta-Dystroglykan und Dystrophin sind in den Intradusalfasern in beiden wildtyp Stämmen vorhanden und in dem Bereich des Sarkolemmes konzentriert, in dem die Intradusalfaser keinen Kontakt zur sensorischen Endigung besitzt. Diese Konzentrierung lässt sich damit begründen, dass die Lokalisation des DGCs eine Bindung an die Basalmembran

benötigt. Die Basalmembran hat nur zwischen den Endigungen des sensorischen Nerven mit der Intrafusalfaser Kontakt (Siehe Abbildung 23; Maier & Mayne, 1995).

Ein Verteilungsmuster für Dystrophin in C57Bl/6-Mäusen, wie in dieser Arbeit beschrieben, wurde bereits von Nahirney und Ovalle publiziert (Nahirney & Ovalle, 1993). Ihre Schlussfolgerung war, dass durch die Abwesenheit von Dystrophin in der Kontaktzone des Nerven und der Intrafusalfaser, das Protein nicht direkt an der Signaltransduktion zwischen Nerv und Muskel beteiligt ist. Meine Arbeit ergänzt diese Erkenntnisse einerseits durch den Nachweis der Konzentrierung von anderen Proteinen des DGCs, dem β -Dystroglykan und dem Utrophin und durch die zusätzliche Untersuchung der DMD^{mdx}-Maus. In dieser dystrophischen Maus fanden sich die Komponenten des DGC zwischen den Kontaktbereichen der annulospiralen Endigungen und der Intrafusalfaser.

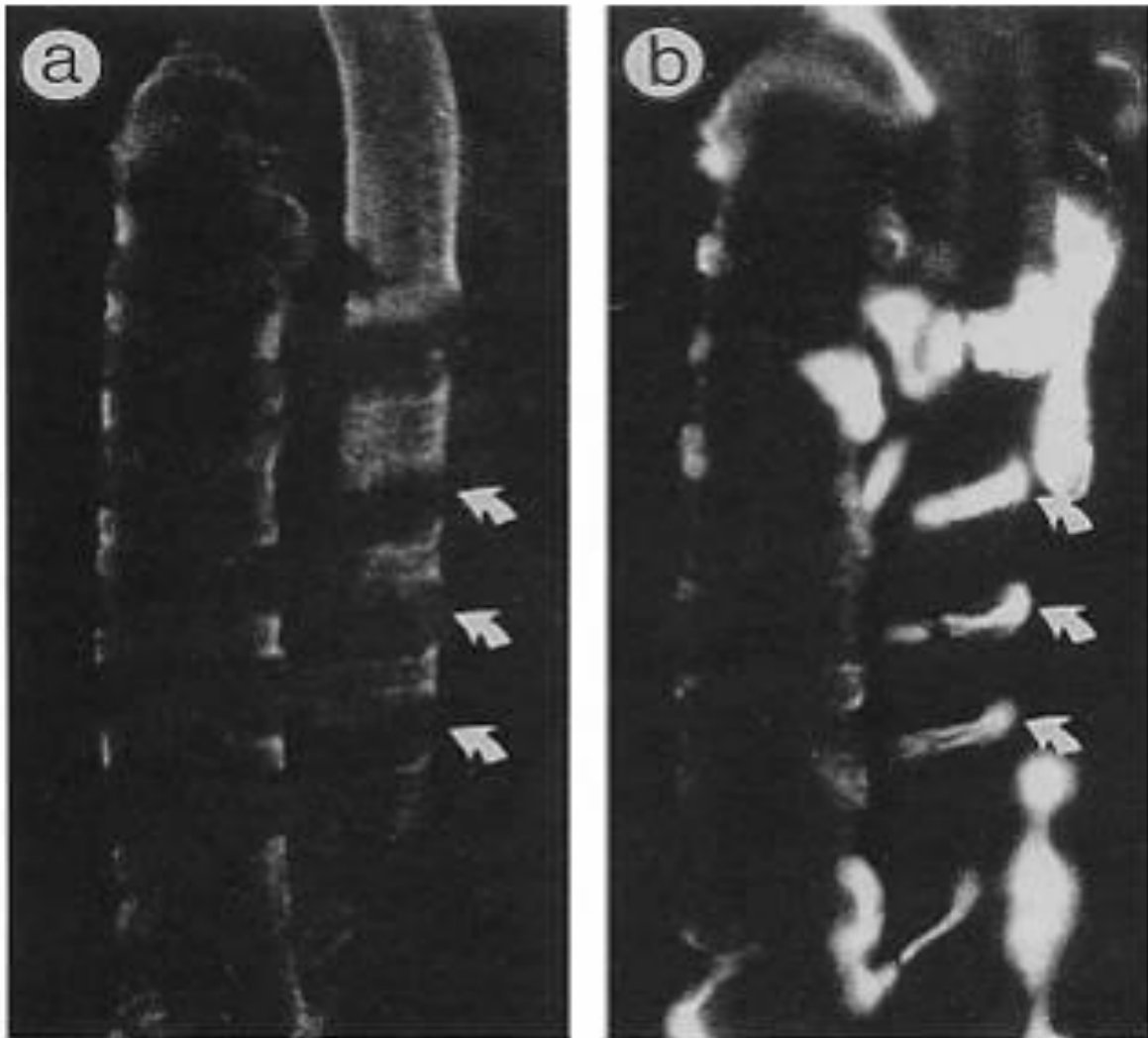


Abbildung 30: Longitudinale Ansicht von zwei Intrafusalfasern im M. soleus der wildtyp-Maus. (Mit der Genehmigung von Nahirney & Ovalle, 1993): (a) Zeigt die Verteilung von Dystrophin und (b) die Verteilung von Neurofilament Protein, welches die annulospiralen Endigungen markiert. Die Pfeile in der Abbildung (a) markieren die Dystrophindefizienten Regionen am Sarkolemm. Sie stimmen überein mit den Kontaktzonen der Annulospiralen Endigungen (Pfeile) in der Abbildung (b).

Die vorliegende Arbeit zeigt in der DMD^{mdx}-Maus kein Dystrophin am Sarkolemm in der Äquatorialregion der Intrafusalfasern. Das Fehlen von Dystrophin konnte bereits an der Neuromuskulären Endplatte gezeigt werden. Wie erwartet wirkt sich der Gendefekt der DMD (Verlust der Expression von Dp427) auf die Intrafusalfasern in gleicher Weise wie auf die Extrafusalfasern aus.

Die Dystrophin Isoform Dp427 kommt hauptsächlich in den Extrafusalfasern der Skelettmuskulatur vor und wurde aufgrund dessen auch in dieser Arbeit in den Intrafusalfasern untersucht. Von weiterem Interesse wäre die Untersuchung von zusätzlichen Dystrophinprodukten des DMD Gens wie das Dp260, das Dp140, das Dp116 und das Dp71 an der Intrafusalfaser. Diese

Dystrophinisoformen werden durch vier interne Promotoren reguliert und befinden sich vorwiegend in der Retina (Dp260), im Gehirn und der Niere (Dp140) sowie im peripheren Nervensystem (Dp116) oder ubiquitär im gesamten Körper (Dp71) (Blake & Kröger, 2000). Dies würde die Frage klären, ob weitere Dystrophinisoformen in Intrafusalfasern der Muskelspindel vorhanden sind, welche durch das hier verwendete Antiserum nicht erkannt wurden. Obwohl es in dieser Hinsicht bisher keine überzeugenden Daten gibt, könnten diese Dystrophin Isoformen theoretisch den Wegfall von Dp427 in der Skelettmuskulatur kompensieren.

Meine Arbeit zeigt eine Lokalisation von β -Dystroglykan in geringer Konzentration entlang des gesamten Sarkolemms der Intrafusalfasern von DMD^{mdx}-Mäusen. Nur in Teilen überlappt die Verteilung von Dystroglykan und Dystrophin. Es stellt sich deshalb die Frage, wie sich die Lokalisation von β -Dystroglykan am Sarkolemm unabhängig von Dystrophin erklären lässt.

Das transmembranäre β -Dystroglykan bildet über Dystrophin eine Verbindung zum Aktin, ein Teil des subsarkolemmalen Zytoskeletts. Das extrazelluläre α -Dystroglykan ist über Laminin-2 und Agrin mit der extrazellulären Matrix verbunden (Abbildung 5). In der DMD^{mdx}-Maus ist β -Dystroglykan in geringerer Intensität an den Intrafusalfasern vorhanden. Diese verminderte Expression von β -Dystroglykan am Sarkolemm wurde bereits in Extrafusalfasern beim DMD-Menschen sowie in der DMD^{mdx}-Maus festgestellt (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992; Rafael et al., 1994). Die Immunreaktivität von β -Dystroglykan ist am Sarkolemm nicht spezifisch in bestimmten Bereichen konzentriert, sondern färbt das Sarkolemm entlang des gesamten zentralen Bereichs. Diese Verteilung von β -Dystroglykan am Sarkolemm weist darauf hin, dass ein Teil von β -Dystroglykan unabhängig von Dystrophin oder Utrophin am Sarkolemm verankert sein muss. Diese Vermutung wird durch die Arbeit von Johnson et al. unterstützt. Sie beschrieben eine Population von β -Dystroglykan an der Muskelfasermembran der Extrafusalfasern unabhängig von Utrophin und Dystrophin (Johnson et al., 2013). Johnson et al. bezeichnete diese Verteilung von β -Dystroglykan als Reservepool. In Muskelspindeln könnte das in den Kontaktbereichen zwischen sensorischer Nervenendigung und Intrafusalfasern konzentrierte β -Dystroglykan ebenso zu einer Art Reservepool gehören. Eine Untersuchung der „dko-Maus“ könnte die Frage klären, ob die Verteilung von β -

Dystroglykan in der Intrafusalfaser auch unabhängig von Utrophin und Dystrophin erfolgt. Zeigt sich in der „dko-Maus“ in Abwesenheit von Utrophin eine gleiche Expression von β -Dystroglykan wie in der DMD^{mdx}-Maus, würde dies auf einen Reservepool hinweisen. Ein Teil der Expression von β -Dystroglykan wäre unabhängig von Utrophin und Dystrophin. Würde das β -Dystroglykan in der „dko-Maus“ in den Muskelspindeln fehlen, wäre die Verteilung abhängig von Utrophin.

Die Ergebnisse meiner Studie zeigen eine Hochregulierung der Utrophin Expression in der DMD^{mdx}-Maus an der Intrafusalfaser. Dieses autosomale Homolog von Dystrophin ist am Sarkolemm der Intrafusalfaser genauso verteilt wie Dystrophin in der wildtyp-Maus. Daher stellt sich die Frage, welche Faktoren die Anwesenheit und die spezifische Verteilung von Utrophin an der Intrafusalfaser beeinflussen. Utrophin und Dystrophin zeigen eine hohe Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz, sowie die Fähigkeit Bindungen mit gleichen zytoskeletalen- und transmembranären Proteinen einzugehen. Utrophin kommt im Vergleich zu Dystrophin ubiquitär im gesamten Körper vor. Dies lässt vermuten, dass die unterschiedliche Expression von Dystrophin und Utrophin von regulatorischen Faktoren abhängt (Galvagni et al., 1997; Khurana et al., 1991). Utrophin ist außerhalb der Neuromuskulären Endplatte in regenerierenden und fetalen Muskelfasern aufzufinden (Lin et al., 1998). Obwohl die regenerierenden Muskeln höhere Level an Utrophin zeigen, ist keine erhöhte Konzentration der Utrophin mRNA in Extrafusalfasern nachzuweisen. Dies führt zu der Vermutung, dass vor allem posttranskriptionelle Regulationen stattfinden, um die Utrophin Konzentration am Sarkolemm zu erhöhen.

Durch welche Mechanismen diese posttranskriptionelle Hochregulierung von Utrophin bewirkt werden könnte, ist bisher noch unklar. Galvagni et al. vermuteten, dass Wachstumsfaktoren und Zytokine, die die Muskelregenerierung vermitteln, zu einer Erhöhung der Utrophin Transkription führen (Galvagni et al., 2002). Gramolini et al. legten dar, dass der Fasertyp der Skelettmuskulatur die Intensität der Hochregulierung von Utrophin bestimmt. Utrophin wird in höheren Konzentrationen in den Typ1-Fasern als in den Typ2-Fasern gemessen (Gramolini et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde nur der M. soleus untersucht, ein überwiegend aus „slow-twitch“ Fasern bestehender Muskel (Barclay et al., 1993).

Es besteht die Möglichkeit, dass in Intrafusalfasern von DMD^{mdx}-Mäusen die Dystrophinmutation durch eine Hochregulierung von Utrophin kompensiert wird. In der Maus führt das in Extrafusalfasern zu einer reduzierten Pathologie. Beim Menschen, bei welchem bisher keine Utrophinhochregulierung festgestellt wurde, könnte dies zu einer eingeschränkten Muskelspindelfunktion führen. Die Folge wäre eine beeinträchtigte Propriozeption, die sich in einem instabilen Gang und einer erhöhten Fallneigung äußern könnte

Die starke Hochregulierung der Expression von Utrophin in intrafusalen Fasern von DMD^{mdx}-Mäusen liefert wichtige therapeutische Anhaltspunkte: Ein besseres Verständnis der Signalkaskade, die der Utrophin-Hochregulation bei DMD^{mdx}-Mäusen zugrunde liegt, könnte bei der Entwicklung von Strategien für eine pharmakologische oder genetische Aktivierung der Utrophin-Expression helfen (Papaioannou und Dimitriou, 2020).

Als therapeutischen Ansatz möchte ich an dieser Stelle die Signifikanz von propriozeptivem Training hervorheben. Die meisten Therapiekonzepte für die Muskeldystrophie Duchenne richten ihre Ansätze hauptsächlich auf eine Verbesserung der Muskelkraft sowie eine Eindämmung der degenerativen muskulären Prozesse aus. Der Stellenwert des Sensorischen Systems, Bewegungsabläufe zu koordinieren, wird in diesen Ansätzen meistens außer Acht gelassen: Durch propriozeptives Training könnte die dysfunktionale Motorik verbessert werden. Eine verbesserte Gleichgewichtssteuerung (Tibone et al., 1997), ein schnelleres Wiedererlernen von Bewegungsabläufen, sowie verlängerte Gehstrecken (Yong und Lee, 2017) konnten bereits durch ein propriozeptives Training erzielt werden. Eine adäquate propriozeptive Informationsverarbeitung ermöglicht zudem eine beschleunigte Heilung von Knochenfrakturen (Blecher et al., 2017a) sowie eine verbesserte Aufrichtung der Wirbelsäule (Blecher et al., 2017b) und verdeutlicht den Stellenwert des Sensorischen Systems in der Therapie der DMD (Kröger 2018).

Therapeutische Strategien von Patienten mit DMD sollten deshalb unbedingt den Erhalt der Muskelspindeln und die Sensibilisierung der Propriozeption umfassen, um eine angemessene motorische Kontrolle aufrechtzuerhalten.

6.2 Strukturelle Veränderungen an den annulospiralen Endigungen

In dieser Arbeit konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Morphologie der sensorischen Endigungen zwischen den gesunden wildtyp und den DMD^{mdx}-Mäusen festgestellt werden. Die Morphologie wurde an der Anzahl der zirkumferentiellen Abschnitte der sensorischen Endigung gemessen. Im Gegensatz dazu zeigten Neuromuskuläre Endplatten in DMD^{mdx}-Mäusen eine deutliche Fragmentierung, die in den wildtyp-Mäusen nicht auftrat. Offensichtlich sind neuro-muskuläre Verbindungen zwischen einer Muskelfaser und dem α -Motoaxon bzw. einer sensorischen Endigung unterschiedlich sensitiv bezüglich einer Mutation im Dystrophin-Gen.

Es ist nicht auszuschließen, dass kleinere strukturelle Veränderungen in der DMD^{mdx}-Maus vorhanden sind, die bei den von mir durchgeführten lichtmikroskopischen Untersuchungen nicht entdeckt werden können. Zum Beispiel die von Banks beschriebene Streckung der äquatorialen Region von „Bag2“-Fasern aus einem Katzenmuskel, die eine Deformation der annulospiralen Endigungen gemeinsam mit der Basallamina und der Muskelfaser zur Folge hat (Banks, 2015), wäre lichtmikroskopisch von mir nicht zu erkennen gewesen. Ähnliche Beobachtungen sind auch durch E. Bendeich (Bendeich et al., 1978) an Froschmuskelspindeln beschrieben. Die sensorischen Endigungen liegen komprimiert zwischen der Basallamina und dem Plasmalemm der Muskelfaser. Mit der Annahme, dass die Endigungen ein konstantes Volumen besitzen, führt die Deformierung zu einer Vergrößerung der Oberfläche der Endigungen. Es ist vorstellbar, dass in der DMD^{mdx}-Maus durch die Muskeldehnung und die ausgeübte Deformation auch die Auflagefläche der annulospiralen Endigungen vergrößert wird. Es bleibt deshalb zukünftigen Untersuchungen überlassen zu klären, ob sich der Kontaktbereich zwischen Basalmembran und sensorischer Nervenendigung bzw. der Intrafusalfaser während einer Dehnung verändert und ob diese Dehnung in wildtyp und dystrophischen Muskeln unterscheidet.

Für zukünftige Forschungen ist die Lage der Muskelspindeln hinsichtlich der Lokalisation des N. tibialis von Interesse: Die Arbeit von Banks weist auf eine erhöhte Komplexität der sensorischen Innervation mit zunehmender Nähe zum innervierenden Nervenstamm hin (Banks et al., 1982). Der N. tibialis ist einer der beiden Hauptäste des N. ischiadicus, der aus den Rückenmarkssegmenten S1

und S2 entspringt. Er innerviert unter anderem den M. soleus. Nahe am innervierenden Nervenstamm gelegene Muskelspindeln zeigen in der Katze eine komplexere Innervation der sensorischen Endigungen als distalere Spindeln. Die Ursachen und die Funktion für diese veränderte Struktur sind nicht bekannt. Es bleibt also zu klären, ob die Anzahl der Umwindungen der annulospiralen Endigungen auch in der Maus abhängig vom Abstand zum innervierenden Nervenstamm sind. In dieser Arbeit wurden die Muskelspindeln nicht in Nervenstamm nah- und fernegelegene Muskelspindeln unterteilt. Dadurch könnte die strukturelle Analyse mit einem Fehler behaftet sein. Durch eine genauere Unterteilung in nervennahe und nervenferne Spindeln könnte in zukünftigen Untersuchungen eine präzisere Aussage über die Struktur der sensorischen Nervenendigungen in der DMD^{mdx}-Maus getroffen werden.

Es wurden keine Intrafusalfasertypen in den Muskelspindeln unterschieden. Die Frage, ob es Unterschiede in der Häufigkeit der sensorischen Umwindungen zwischen den einzelnen intrafusalen Fasertypen gibt, kann daher nicht abschließend beantwortet werden. Um eine Aussage dazu zu erhalten, könnten ähnliche Ansätze zur histochemischen und ultrastrukturellen Bestimmung wie die von Banks et al. genutzt werden (Banks et al., 1977a). Histochemisch lassen sich nämlich bei den Kernsackfasern je nach Beschaffenheit ihrer Myosin-ATPase die „Bag1“ und die „Bag2“-Fasern unterscheiden. Ultrastrukturelle Unterschiede hingegen zeichnen sich anhand des Durchmessers ab, der bei Kernkettenfasern mit 10-12 µm dünner als der bei den Kernsackfasern in Höhe von 20-25 µm ist. Eine vergleichbare Analyse könnte gegebenenfalls zwischen wildtyp und dystrophischen Muskelspindeln gemacht werden.

Um mögliche Unterschiede in der Struktur der zirkumferentiellen Abschnitte der sensorischen Endigungen zwischen der DMD^{mdx}-Maus und den wildtyp-Mäusen zu erkennen, ist es wichtig, die Auswirkung einer Dehnung auf die Struktur der Nervenendigungen zu betrachten sowie die Muskelspindeln in nervenstammnahe und -ferne zu unterteilen. Die Differenzierung in Kernketten-, der „Bag1“ und der „Bag2“-Fasern könnte ebenfalls weitere Erkenntnisse dazu liefern, ob strukturelle Veränderungen in den Intrafusalfasern von DMD^{mdx}-Mäusen vorhanden sind, die mit einer möglichen beeinträchtigten Propriozeption korreliert werden können.

6.3 Die Anzahl der Muskelspindeln in der C57Bl/6-, der C57Bl/10SnJ- und der DMD^{mdx}-Maus

Es wurden neun Soleus Muskeln komplett seriell geschnitten und alle ca. 100 Schnitte pro Muskel immunhistochemisch untersucht. Das Ziel war, die genaue Anzahl von Muskelspindeln pro Muskel zu bestimmen und zu klären, ob die Mutation im Dystrophin Gen Auswirkungen auf die Anzahl der Muskelspindeln pro Muskel hat. Diese Degeneration in den Extrafusalfasern ist die Ursache für die progressive Muskelschwäche der DMD Patienten. In der Auszählung von den insgesamt neun Soleus Muskeln der wildtyp-Mäuse und der DMD^{mdx}-Maus konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Muskelspindeln pro Muskel festgestellt werden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Anzahl an Muskelspindeln nicht kausal mit der hohen Fallneigung der Patienten in Verbindung gebracht werden kann, da zumindest im Mausmodell kein Nachweis für eine veränderte Muskelspindeldichte erbracht werden konnte.

In der hier angewandten Methode zur Darstellung der Muskelspindeln wird mit dem indirekten Nachweis mittels Antikörper gegen den vesikulären Glutamatttransporter VGluT1 gearbeitet. Alternativ könnte die sensorische Nervenendigung auch genetisch über eine Expression eines fluoreszierenden Proteins (EGFP oder YFP) unter dem Thy-1 Promotor markiert werden. Durch diese direkte Kennzeichnung der Nervenstrukturen könnte die Immunhistochemie als mögliche Fehlerquelle ausgeschlossen werden. Die sensorische Nervenendigung wäre besser darstellbar, da EGFP das gesamte Zytoplasma ausfüllt. Im Vergleich zu VGluT1, der ausschließlich auf Vesikeln vorkommt, verteilt sich EGFP weiter in die Nervenendigungen. Weitere Vorteile wären die schnellere und kostengünstigere Anwendung.

Studien von Kokkorogianni und von Totsuka et al. beschreiben eine Abhängigkeit der Muskelspindelanzahl von der biochemischen Muskelfaserzusammensetzung eines Muskels. So ist Kokkorogianni zufolge, die Anzahl der Muskelspindeln in Gebieten mit gesteigertem oxidativen Muskelfaseraufkommen besonders hoch (Kokkorogiannis, 2004; Totsuka et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde der M. soleus, der überwiegend aus Slow-Twitch-Fasern aufgebaut ist, untersucht (Barclay et al., 1993). Sinnvoll wäre die Analyse eines weiteren Muskels wie zum Beispiel des M. extensor digitorum longus (EDL) als ein wesentlicher Fast-Twitch-Muskel der Maus.

Vermutlich sind Muskeln mit hohem oxidativen Muskelfaseraufkommen stärker von degenerativen Prozessen beeinträchtigt. Es könnte die Frage untersucht werden, ob die DMD die Anzahl der Spindeln in Muskeln mit überwiegend Fast-Twitch-Fasern stärker beeinflusst als Muskeln mit überwiegend Slow-Twitch-Fasern. Um dieser Frage nachzugehen, könnte der „oxidative Index“ angewandt werden: Dieser beschreibt das prozentuale Verhältnis von extrafusalen Muskelfasern, die entweder vom Typ-1, vom Typ-2a oder vom Typ-2b stammen.

Für eine weitere Validierung der Anzahl der Muskelspindeln könnte die genetische Kennzeichnung mit fluoreszierenden Proteinen (EGFP oder YFP) gearbeitet werden, die Auswirkung der Muskelfaserzusammensetzung betrachtet werden und weitere Muskeln ausgewertet werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die in meiner Arbeit vorgestellten Daten Hinweise auf eine Beteiligung der Muskelspindeln an der Pathogenese der Muskeldystrophie geben. Sie weisen auf eine komplexe Funktionalität des Dystrophin-assoziierten-Glykoproteinkomplexes hin. Dieses Erkenntnis über die veränderte molekulare Ausstattung von Muskelspindeln in der Muskeldystrophie Duchenne könnte die Gangunsicherheit bei Patienten mit DMD erklären. Die Hochregulierung der Expression von Utrophin liefert zudem einen wichtigen Anhaltspunkt, der für die Entwicklung von neuen Therapiestrategien zur Bekämpfung der Muskeldystrophie Duchenne herangezogen werden sollte.

7 Literaturverzeichnis

Abbs, S., Tuffery-Giraud, S., Bakker, E., Ferlini, A., Sejersen, T. & Mueller, C. R. (2010). Best practice guidelines on molecular diagnostics in Duchenne/Becker muscular dystrophies. *Neuromuscular Disorders*, 20(6), 422-427.

Aimonetti, J. M., Ribot-Ciscar, E., Rossi-Durand, C., Attarian, S., Pouget, J., & Roll, J. P. (2005). Functional sparing of intrafusal muscle fibers in muscular dystrophies. *aMuscle Nerve*, 32(1), 88-94.

Allikian, M. J. & McNally, E. M. (2007). Processing and assembly of the dystrophin glycoprotein complex. *Traffic*, 8(3), 177-183.

Aman, J. E., Elangovan, N., Yeh, I. L., & Konczak, J. (2014). The effectiveness of proprioceptive training for improving motor function: a systematic review. *Frontiers in Human Neuroscience*, 8, 1075.

Archer, J. D., Vargas, C. C. & Anderson, J. E. (2006). Persistent and improved functional gain in mdx dystrophic mice after treatment with L-arginine and deflazacort. *FASEB Journal*, 20(6), 738-740.

Augier, N., Boucraut, J., Leger, J., Anol, M., Nicholson, L. V., Voelkel, M. A., Pellissier, J. F. (1992). A homologue of dystrophin is expressed at the blood vessel membrane of DMD and BMD patients: immunological evidence. *Journal of the Neurological Sciences*, 107(2), 233-238.

Banks, G. B., Fuhrer, C., Adams, M. E. & Froehner, S. C. (2003). The postsynaptic submembrane machinery at the neuromuscular junction: Requirement for rapsyn and the utrophin/dystrophin- associated complex. *Journal of Neurocytology*, 32(5-8), 709-726.

Banks, R. W. (1994). The motor innervation of mammalian muscle-spindles. *Progress in Neurobiology*, 43(4-5), 323-362.

Banks, R. W. (2006). An allometric analysis of the number of muscle spindles in mammalian skeletal muscles. *Journal of Anatomy*, 208(6), 753-768.

Banks, R. W. (2015). The innervation of the muscle spindle: a personal history. *Journal of Anatomy*, 227(2), 115-135.

Banks, R. W., Barker, D. & Stacey, M. J. (1982). Form and distribution of sensory terminals in cat hindlimb muscle spindles. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, 299(1096), 329-364.

Banks, R. W., Harker, D. W. & Stacey, M. J. (1977a). A study of mammalian intrafusal muscle fibres using a combined histochemical and ultrastructural technique. *Journal of Anatomy*, 123(Pt 3), 783-796.

Barclay, C. J., Constable, J. K. & Gibbs, C. L. (1993). Energetics of fast- and slow-twitch muscles of the mouse. *The Journal of Physiology*, 472, 61-80.

Barresi, R. & Campbell, K. P. (2006). Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 2), 199-207.

Bates, G., Sigurdardottir, S., Kachmar, L., Zitouni, N. B., Benedetti, A., Petrof, B. J., Lauzon, A. M. (2013). Molecular, cellular, and muscle strip mechanics of the

mdx mouse diaphragm. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 304(9), C873-880.

Beck, J., Weinberg, J., Hamnegard, C. H., Spahija, J., Olofson, J., Grimby, G. & Sinderby, C. (2006). Diaphragmatic function in advanced Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*, 16(3), 161-167.

Bendeich, E. G., Hooker, W. M. & Karlsson, U. L. (1978). Sensory nerve deformation in the stimulated frog muscle spindle. *Journal of Ultrastructural Research*, 62(2), 137-146.

Berger, J. & Currie, P. D. (2012). Zebrafish models flex their muscles to shed light on muscular dystrophies. *Disease Models & Mechanisms*, 5(6), 726-732.

Bewick, G. S., Nicholson, L. V., Young, C. & Slater, C. R. (1993). Relationship of a dystrophin-associated glycoprotein to junctional acetylcholine receptor clusters in rat skeletal muscle. *Neuromuscular Disorders*, 3(5-6), 503-506.

Bewick, G. S., Nicholson, L. V. B., Young, C., O'Donnell, E., & Slater, C. R. (1992). Different distributions of dystrophin and related proteins at nerve-muscle junctions. *Neuroreport*, 3, 857-860.

Blake, D. J. & Kröger, S. (2000). The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *Trends in Neurosciences*, 23(3), 92-99.

Blecher, R., Krief, S., Galili, T., Assaraf, E., Stern, T., Anekstein, Y., Agar, G., Zelzer, E., (2017a). The proprioceptive system regulates morphologic restoration of fractured bones. *Cell reports*, 20, 1775-1783

Blecher, R., Krief, S., Galili, T., Biton, I.E., Stern, T., Assaraf, E., Levanon, D., Appel, E., Anekstein, Y., Agar, G., Groner, Y., Zelzer, E., 2017b. The proprioceptive system masterminds spinal alignment: Insight into the mechanism of scoliosis. *Development Cell*, 388-399 e383

Bostick, B., Yue, Y. & Duan, D. (2010). Gender influences cardiac function in the mdx model of Duchenne cardiomyopathy. *Muscle Nerve*, 42(4), 600-603.

Bulfield, G., Siller, W. G., Wight, P. A. & Moore, K. J. (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 81(4), 1189-1192.

Bushby, K., Finkel, R., Birnkrant, D. J., Case, L. E., Clemens, P. R., Cripe, L., Group, D. M. D. C. C. W. (2010). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *The Lancet Neurology*, 9(1), 77-93.

Bushby, K., Finkel, R., Wong, B., Barohn, R., Campbell, C., Comi, G. P., Ptc124-Gd-007-Dmd Study, G. (2014). Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle Nerve*, 50(4), 477-487.

Calcedo, R. & Wilson, J. M. (2013). Humoral Immune Response to AAV. *Frontiers in Immunology*, 4, 341.

Chang, N. C., Chevalier, F. P. & Rudnicki, M. A. (2016). Satellite Cells in Muscular Dystrophy - Lost in Polarity. *Trends in Molecular Medicine*, 22(6), 479-496.

- Chamberlain, J. S., Metzger, J., Reyes, M., Townsend, D., & Faulkner, J. A. (2007). Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. *FASEB Journal*, 21(9), 2195-2204.
- Chung, J., Smith, A. L., Hughes, S. C., Niizawa, G., Abdel-Hamid, H. Z., Naylor, E. W., Clemens, P. R. (2016). Twenty-year follow-up of newborn screening for patients with muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, 53(4), 570-578.
- Clarke, J. L. & Gowers, W. R. (1874). On a Case of Pseudo-hypertrophic Muscular Paralysis. *Medico-Chirurgical Transactions*, 57, 247-260.5
- Coulton, G. R., Curtin, N. A., Morgan, J. E. & Partridge, T. A. (1988). The mdx mouse skeletal muscle myopathy: II. Contractile properties. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 14(4), 299-314.
- Dangain, J. & Vrbova, G. (1984). Muscle development in mdx mutant mice. *Muscle Nerve*, 7(9), 700-704.
- Davidson, Z. E. & Truby, H. (2009). A review of nutrition in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 22(5), 383-393.
- Davies, K.E., Chamberlin, J.S., (2019). Surrogate gene therapy for muscular dystrophy. *Nature Medicine* 25, 1473-1474.
- De Bruin, P. F., Ueki, J., Bush, A., Khan, Y., Watson, A. & Pride, N. B. (1997). Diaphragm thickness and inspiratory strength in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Thorax*, 52(5), 472-475.
- Deconinck, A. E., Rafael, J. A., Skinner, J. A., Brown, S. C., Potter, A. C., Metzinger, L., Davies, K. E. (1997). Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, 90, 717-727.
- Desaki, J., 2001, Scanning Electron Microscopic Study of Muscle Spindles in the Tenuissimus Muscle of the Chinese Hamster: With Reference to the Outer Capsule, Inner Capsule and Fusimotor Endings. *Journal of Electron Microscopy* (Tokyo) 50(1), 65-72.
- Deschenes, M. R. (2011). Motor unit and neuromuscular junction remodeling with aging. *Current Aging Science*, 4(3), 209-220.
- Dubowitz, V. (2000). What is muscular dystrophy? Forty years of progressive ignorance. *Journal of the Royal College of Physicians of London*, 34(5), 464-468.
- Emery, A. E. H. (2002). The muscular dystrophies. *Lancet*, 359(9307), 687-695.
- Englund, S. B., Nicholson, L. V. B., Johnson, M. A., Forrest, S. M., Love, D. R., Zubrzycka-Gaarn, E. F., Davies, K. E. (1990). Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature*, 343, 180-182.
- Ervasti, J. M. & Campbell, K. P. (1991). Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell*, 66, 1121-1131.
- Ervasti, J. M. & Campbell, K. P. (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *Journal of Cell Biology*, 122(4), 809-823.

- Fois, C., Medioni, J. & Le Bourg, E. (1991). Habituation of the proboscis extension response as a function of age in *Drosophila melanogaster*. *Gerontology*, 37(4), 187-192.
- Frontera, W. R. & Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int*, 96(3), 183-195.
- Gage, G. J., Kipke, D. R. & Shain, W. (2012). Whole animal perfusion fixation for rodents. *Journal of Visualized Experiments*(65).
- Galvagni, F., Lestingi, M., Cartocci, E. & Oliviero, S. (1997). Serum response factor and protein-mediated DNA bending contribute to transcription of the dystrophin muscle-specific promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 17(3), 1731-1743.
- Gatta, V., Scarciolla, O., Gaspari, A. R., Palka, C., De Angelis, M. V., Di Muzio, A., Stuppia, L. (2005). Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA). *Human Genetics*, 117(1), 92-98.
- Gee, S. H., Blacher, R. W., Douville, P. J., Provost, P. R., Yurchenco, P. D. & Carbonetto, S. (1993). Laminin-binding protein 120 from brain is closely related to the dystrophin-associated glycoprotein, dystroglycan, and binds with high affinity to the major heparin binding domain of laminin. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 14972-14980.
- Gee, S. H., Madhavan, R., Levinson, S. R., Caldwell, J. H., Sealock, R. & Froehner, S. C. (1998). Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *Journal of Neuroscience*, 18(1), 128-137.
- Gerwin, L., Rossmannith, S., Haupt, C., Schultheiss, J., Brinkmeier, H., Bittner, R.E., Kröger, S., 2020. Impaired muscle spindle function in murine models of muscular dystrophy. *The Journal of Physiology* 598, 1591-1609.
- Gilbert, R., Nalbantoglu, J., Petrof, B. J., Ebihara, S., Guibinga, G. H., Tinsley, J. M., Karpatis, G. (1999). Adenovirus-mediated utrophin gene transfer mitigates the dystrophic phenotype of mdx mouse muscles. *Human Gene Therapy*, 10(8), 1299-1310.
- Gillis, J. M. (1999). Understanding dystrophinopathies: an inventory of the structural and functional consequences of the absence of dystrophin in muscles of the mdx mouse. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 20, 605-625.
- Godfrey, C., Clement, E., Mein, R., Brockington, M., Smith, J., Talim, B., Muntoni, F. (2007). Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain*, 130(Pt 10), 2725-2735.
- Gosselin, L. E. & Williams, J. E. (2006). Pentoxifylline fails to attenuate fibrosis in dystrophic (mdx) diaphragm muscle. *Muscle Nerve*, 33(6), 820-823.
- Gramolini, A. O., Belanger, G., Thompson, J. M., Chakkalakal, J. V. & Jasmin, B. J. (2001). Increased expression of utrophin in a slow vs. a fast muscle involves posttranscriptional events. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 281(4), C1300-C1309.

Granit, R. (1975). The functional role of the muscle spindles--facts and hypotheses. *Brain*, 98(4), 531-556.

Guiraud, S., Edwards, B., Babbs, A., Squire, S.E., Berg, A., Moir, L., Wood, M.J., Davies, K.E., (2019) The potential of utrophin and dystrophin combination therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics* 28, 2189-2200.

Hara, Y., Balci-Hayta, B., Yoshida-Moriguchi, T., Kanagawa, M., Beltran-Valero de Bernabe, D., Gundesli, H., Campbell, K. P. (2011). A dystroglycan mutation associated with limb-girdle muscular dystrophy. *The New England Journal of Medicine*, 364(10), 939-946.

Helliwell, T. R., Man, N. T., Morris, G. E. & Davies, K. E. (1992). The dystrophin-related protein, utrophin, is expressed on the sarcolemma of regenerating human skeletal muscle fibres in dystrophies and inflammatory myopathies. *Neuromuscular Disorders*, 2(3), 177-184.

Hemler, M. E. (1999). Dystroglycan versatility. *Cell*, 97(5), 543-546.

Hirst R.C., McCullagh, K.J., Davies, K.E., (2005). Utrophin upregulation in Duchenne muscular dystrophy. *Acta myologica* 24, 209-216.

Hoffman, E. P., Brown, R. H., Jr. & Kunkel, L. M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 51(6), 919-928.

Hsu, J. D. & Furumasu, J. (1993). Gait and posture changes in the Duchenne muscular dystrophy child. *Clinical Orthopaedics and Related Research*(288), 122-125.

Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Ervasti, J. M., Leveille, C. J., Slaughter, C. A., Sernett, S. W. & Campbell, K. P. (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*, 355, 696-702.

Johnson, E. K., Li, B., Yoon, J. H., Flanigan, K. M., Martin, P. T., Ervasti, J. & Montanaro, F. (2013). Identification of new dystroglycan complexes in skeletal muscle. *PLoS One*, 8(8), e73224.

Kararizou, E. G., Manta, P., Kalfakis, N., Gkias, K. A. & Vassilopoulos, D. (2007). Morphologic and morphometrical study of the muscle spindle in muscular dystrophy. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 29(3), 148-152.

Keep, N. H. (2000). Structural comparison of actin binding in utrophin and dystrophin. *Neurological Sciences*, 21(5 Suppl), S929-937.

Khairallah, M., Khairallah, R., Young, M. E., Dyck, J. R., Petrof, B. J. & Des Rosiers, C. (2007). Metabolic and signaling alterations in dystrophin-deficient hearts precede overt cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 43(2), 119-129.

Khurana, T. S., Watkins, S. C., Chafey, P., Chelly, J., Tome, F. M., Fardeau, M., Kunkel, L. M. (1991). Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. *Neuromuscular Disorders*, 1(3), 185-194.

- Kinali, M., Arechavala-Gomeza, V., Feng, L., Cirak, S., Hunt, D., Adkin, C., Muntoni, F. (2009). Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *The Lancet Neurology*, 8(10), 918-928.
- Kokkorigiannis, T. (2004). Somatic and intramuscular distribution of muscle spindles and their relation to muscular angiotypes. *Journal of Theoretical Biology*, 229(2), 263-280.
- Kröger, S. (2018). Proprioception 2.0: novel functions for muscle spindles. *Current Opinion in Neurology*, 31(5):592-598.
- Kröger, S. (2020). Proprioception and Muscle Spindle Function in Muscular Dystrophies. *Neuromuscular Disorders*, submitted
- Kumar, A. & Boriek, A. M. (2003). Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. *FASEB Journal*, 17(3), 386-396.
- Lin, S., Gaschen, F. & Burgunder, J. M. (1998). Utrophin is a regeneration-associated protein transiently present at the sarcolemma of regenerating skeletal-muscle fibers in dystrophin-deficient hypertrophic feline muscular dystrophy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 57, 780-790.
- Lionikas, A., Smith, C. J., Smith, T. L., Bunger, L., Banks, R. W. & Bewick, G. S. (2013). Analyses of muscle spindles in the soleus of six inbred mouse strains. *Journal of Anatomy*, 223(3), 289-296.
- Maier, A. (1997). Development and regeneration of muscle spindles in mammals and birds. *The International Journal of Development Biology*, 41(1), 1-17.
- Maier, A. & Mayne, R. (1995). Basal lamina development in chicken muscle spindles. *Development Dynamics*, 202(3), 284-293.
- McDonald, C. M., Abresch, R. T., Carter, G. T., Fowler, W. M., Jr., Johnson, E. R., Kilmer, D. D. & Sigford, B. J. (1995). Profiles of neuromuscular diseases. Duchenne muscular dystrophy. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, 74(5 Suppl), S70-92.
- Mercuri, E. & Muntoni, F. (2013). Muscular dystrophy: new challenges and review of the current clinical trials. *Current Opinion in Pediatrics*, 25(6), 701-707.
- Meriney, S. D. & Dittrich, M. (2013). Organization and function of transmitter release sites at the neuromuscular junction. *The Journal of Physiology*, 591(13), 3159-3165.
- Messina, S., Vita, G. L., Aguenouz, M., Sframeli, M., Romeo, S., Rodolico, C. & Vita, G. (2011). Activation of NF-kappaB pathway in Duchenne muscular dystrophy: relation to age. *Acta Myologica*, 30(1), 16-23.
- Milnerwood, A. J., Kaufman, A. M., Sepers, M. D., Gladding, C. M., Zhang, L., Wang, L., Raymond, L. A. (2012). Mitigation of augmented extrasynaptic NMDAR signaling and apoptosis in cortico-striatal co-cultures from Huntington's disease mice. *Neurobiology Disorders*, 48(1), 40-51.

Monaco, A. P., Neve, R. L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C. J., Kurnit, D. M. & Kunkel, L. M. (1986). Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature*, 323(6089), 646-650.

Moore, J. C. (1984). The Golgi tendon organ: a review and update. *The American Journal of Occupational Therapy*, 38(4), 227-236.

Morrison, J., Lu, Q. L., Pastoret, C., Partridge, T. & Bou-Gharios, G. (2000). T-cell-dependent fibrosis in the mdx dystrophic mouse. *Laboratory Investigation*, 80(6), 881-891.

Murugan, S., Chandramohan, A. & Lakshmi, B. R. (2010). Use of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene mutation analysis. *The Indian Journal of Medicine Research*, 132, 303-311.

Nahirney, P. C. & Ovalle, W. K. (1993). Distribution of dystrophin and neurofilament protein in muscle spindles of normal and Mdx-dystrophic mice: an immunocytochemical study. *The Anatomical Record*, 235(4), 501-510.

Nakae, Y., Dorchie, O. M., Stoward, P. J., Zimmermann, B. F., Ritter, C. & Ruegg, U. T. (2012). Quantitative evaluation of the beneficial effects in the mdx mouse of epigallocatechin gallate, an antioxidant polyphenol from green tea. *Histochemistry and Cell Biology*, 137(6), 811-827.

Nakamura, A. & Takeda, S. (2011). Mammalian models of Duchenne Muscular Dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 184393.

Nawrotzki, R., Blake, D. J. & Davies, K. E. (1996). The genetic basis of neuromuscular disorders. *Trends in Genetics*, 12(8), 294-298.

Neuen-Jacob, E. (2009). Muscular dystrophies. *Pathologe*, 30(5), 357-364.

Nicholson, L. V., Johnson, M. A., Gardner-Medwin, D., Bhattacharya, S. & Harris, J. B. (1990). Heterogeneity of dystrophin expression in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Acta Neuropathologica*, 80(3), 239-250.

Ohlendieck, K., Ervasti, J. M., Snook, J. B. & Campbell, K. P. (1991). Dystrophin-glycoprotein complex is highly enriched in isolated skeletal muscle sarcolemma. *The Journal of Cell Biology*, 112(1), 135-148.

Okinaka, S., Kumagai, H., Ebashi, S., Sugita, H., Momoi, H., Toyokura, Y. & Fujie, Y. (1961). Serum creatine phosphokinase. Activity in progressive muscular dystrophy and neuromuscular diseases. *Archives of Neurology*, 4, 520-525.

Ovalle, W. K. & Smith, R. S. (1972). Histochemical identification of three types of intrafusal muscle fibers in the cat and monkey based on the myosin ATPase reaction. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 50(3), 195-202.

Papaioannou, S., Dimitriou, M., 2020. Muscle spindle function in muscular dystrophy: A potential target for therapeutic intervention. *The Journal of Physiology* 598, 1433-1434

Pierno, S., Nico, B., Burdi, R., Liantonio, A., Didonna, M. P., Cippone, V., De Luca, A. (2007). Role of tumour necrosis factor alpha, but not of cyclo-oxygenase-2-derived eicosanoids, on functional and morphological indices of dystrophic

- progression in mdx mice: a pharmacological approach. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 33(3), 344-359.
- Pilgram, G. S., Potikanond, S., Baines, R. A., Fradkin, L. G. & Noordermeer, J. N. (2010). The roles of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the synapse. *Molecular Neurobiology*, 41(1), 1-21.
- Pogue, R., Anderson, L. V., Pyle, A., Sewry, C., Pollitt, C., Johnson, M. A., Bushby, K. M. (2001). Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromuscular Disorders*, 11(1), 80-87
- Pons, F., Nicholson, L. V., Robert, A., Voit, T. & Leger, J. J. (1993). Dystrophin and dystrophin-related protein (utrophin) distribution in normal and dystrophin-deficient skeletal muscles. *Neuromuscular Disorders*, 3(5-6), 507-514.
- Pöppele, R. E., Kennedy, W. R. & Quick, D. C. (1979). A determination of static mechanical properties of intrafusal muscle in isolated cat muscle spindles. *Neuroscience*, 4(3), 401-411.
- Pratt, S. J., Valencia, A. P., Le, G. K., Shah, S. B. & Lovering, R. M. (2015). Pre- and postsynaptic changes in the neuromuscular junction in dystrophic mice. *Frontiers in Physiology*, 6, 252.
- Proske, U. & Gandevia, S. C. (2012). The proprioceptive senses: their roles in signaling body shape, body position and movement, and muscle force. *Physiological Reviews*, 92(4), 1651-1697.
- Rafael, J. A., Sunada, Y., Cole, N. M., Campbell, K. P., Faulkner, J. A. & Chamberlain, J. S. (1994). Prevention of dystrophic pathology in mdx mice by a truncated dystrophin isoform. *Human Molecular Genetics*, 3(10), 1725-1733.
- Rahimov, F. & Kunkel, L. M. (2013). The cell biology of disease: cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. *The Journal of Cell Biology*, 201(4), 499-510.
- Ramos, J. & Chamberlain, J. S. (2015). Gene Therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Orphan Drugs*, 3(11), 1255-1266.
- Ribot-Ciscar, E., Trefouret, S., Aimonetti, J. M., Attarian, S., Pouget, J. & Roll, J. P. (2004). Is muscle spindle proprioceptive function spared in muscular dystrophies? A muscle tendon vibration study. *Muscle Nerve*, 29(6), 861-866.
- Ruffini, A. (1898). On the Minute Anatomy of the Neuromuscular Spindles of the Cat, and on their Physiological Significance. *The Journal of Physiology*, 23(3), 190-208.
- Scheuerbrandt, G. (1998). First meeting of the Duchenne Parent Project in Europe: Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. 7-8 November 1997, Rotterdam, The Netherlands. *Neuromuscular Disorders*, 8(3-4), 213-219.
- Schofield, J., Houzelstein, D., Davies, K., Buckingham, M. & Edwards, Y. H. (1993). Expression of the dystrophin-related protein (utrophin) gene during mouse embryogenesis. *Development Dynamics*, 198(4), 254-264.
- Schroder, J. M., Bodden, H., Hamacher, A. & Verres, C. (1989). Scanning electron microscopy of teased intrafusal muscle fibers from rat muscle spindles. *Muscle Nerve*, 12(3), 221-232.

- Selsby, J. T., Ross, J. W., Nonneman, D. & Hollinger, K. (2015). Porcine models of muscular dystrophy. *ILAR Journal*, 56(1), 116-126.
- Sharp, N. J., Kornegay, J. N., Van Camp, S. D., Herbstreith, M. H., Secore, S. L. & Kettle, S. (1992). An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics*, 13(1), 115-121.
- Sherrington, C. S. (1894). On the Anatomical Constitution of Nerves of Skeletal Muscles; with Remarks on Recurrent Fibres in the Ventral Spinal Nerve-root. *The Journal of Physiology*, 17(3-4), 212-258.
- Sicinski, P., Geng, Y., Ryder-Cook, A. S., Barnard, E. A., Darlison, M. G. & Barnard, P. J. (1989). The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*, 244(4912), 1578-1580.
- Simonds, A. K. (2006). Recent advances in respiratory care for neuromuscular disease. *Chest*, 130(6), 1879-1886.
- Simonds, A. K., Muntoni, F., Heather, S. & Fielding, S. (1998). Impact of nasal ventilation on survival in hypercapnic Duchenne muscular dystrophy. *Thorax*, 53(11), 949-952.
- Sine, S. M. (2012). End-plate acetylcholine receptor: structure, mechanism, pharmacology, and disease. *Physiological Reviews*, 92(3), 1189-1234.
- Skuk, D., Goulet, M. & Tremblay, J. P. (2006). Use of repeating dispensers to increase the efficiency of the intramuscular myogenic cell injection procedure. *Cell Transplantation*, 15(7), 659-663.
- Skuk, D., Goulet, M. & Tremblay, J. P. (2010). Preservation of muscle spindles in a 27-year-old Duchenne muscular dystrophy patient: importance for regenerative medicine strategies. *Muscle Nerve*, 41(5), 729-730.
- Smith, R. S. & Ovalle, W. K. (1972). The structure and function of intrafusal muscle fibers. *Muscle Biology*, 1, 147-227.
- Soudon, P., Steens, M. & Toussaint, M. (2008). A comparison of invasive versus noninvasive full-time mechanical ventilation in Duchenne muscular dystrophy. *Chronic Respiratory Disease*, 5(2), 87-93.
- Stevens, E. D. & Faulkner, J. A. (2000). The capacity of mdx mouse diaphragm muscle to do oscillatory work. *The Journal of Physiology*, 522 Pt 3, 457-466.
- Suzuki, A., Yoshida, M., Yamamoto, H. & Ozawa, E. (1992). Glycoprotein-binding site of dystrophin is confined to the cysteine-rich domain and the first half of the carboxy-terminal domain. *FEBS Letters*, 308, 154-160.
- Swash, M. & Fox, K. P. (1976). The pathology of the muscle spindle in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of the Neurological Sciences*, 29(1), 17-32.
- Tinsley, J. M., Blake, D. J., Roche, A., Fairbrother, U., Riss, J., Byth, B. C., alle Autoren aufführen!! Davies, K. E. (1992). Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature*, 360, 591-593.
- Tibone, J.E., Fechter, J., Kao, J.T., 1997. Evaluation of a proprioception pathway in patients with stable and unstable shoulders with somatosensory cortical evoked potentials. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery* 6, 440-443.

Totsuka, Y., Nagao, Y., Horii, T., Yonekawa, H., Imai, H., Hatta, H., Atomi, Y. (2003). Physical performance and soleus muscle fiber composition in wild-derived and laboratory inbred mouse strains. *Journal of Applied Physiology*, 95(2), 720-727.

Turner, P. R., Schultz, R., Ganguly, B. & Steinhardt, R. A. (1993). Proteolysis results in altered leak channel kinetics and elevated free calcium in mdx muscle. *The Journal of Membrane Biology*, 133(3), 243-251.

Vandebrouck, C., Martin, D., Colson-Van Schoor, M., Debaix, H. & Gailly, P. (2002). Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *The Journal of Cell Biology*, 158(6), 1089-1096.

Vulin, A., Wein, N., Simmons, T. R., Rutherford, A. M., Findlay, A. R., Yurkoski, J. A., Flanigan, K. M. (2015). The first exon duplication mouse model of Duchenne muscular dystrophy: A tool for therapeutic development. *Neuromuscular Disorders*, 25(11), 827-834.

Waite, A., Brown, S. C. & Blake, D. J. (2012). The dystrophin-glycoprotein complex in brain development and disease. *Trends in Neurosciences*, 35(8), 487-496.

Waite, A., Tinsley, C. L., Locke, M. & Blake, D. J. (2009). The neurobiology of the dystrophin-associated glycoprotein complex. *Annals of Medicine*, 41(5):344-59.

Wallace, G. Q. & McNally, E. M. (2009). Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annual Review of Physiology*, 71, 37-57.

Wang, Z., Li, L. Y., Taylor, M. D., Wright, D. E. & Frank, E. (2007). Prenatal exposure to elevated NT3 disrupts synaptic selectivity in the spinal cord. *Journal of Neuroscience*, 27(14), 3686-3694.

Wehling-Henricks, M., Jordan, M. C., Roos, K. P., Deng, B. & Tidball, J. G. (2005). Cardiomyopathy in dystrophin-deficient hearts is prevented by expression of a neuronal nitric oxide synthase transgene in the myocardium. *Human Molecular Genetics*, 14(14), 1921-1933.

Willmann, R., Possekkel, S., Dubach-Powell, J., Meier, T. & Ruegg, M. A. (2009). Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*, 19(4), 241-249.

Yiu, E. M. & Kornberg, A. J. (2015). Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 51(8), 759-764.

Yong, M.S., Lee, Y.S., 2017. Effect of ankle proprioceptive exercise on static and dynamic balance in normal adults. *The Journal of Physical Therapy Science* 29, 242-244.

Zatz, M., Rapaport, D., Vainzof, M., Passos-Bueno, M. R., Bortolini, E.R., Pavanello Rde, C., & Peres, C. A. (1991). Serum creatine-kinase (CK) and pyruvate-kinase (PK) activities in Duchenne (DMD) as compared with Becker

(BMD) muscular dystrophy. *Journal of the Neurological Sciences*, 102(2), 190-196.

Zeiger, U., Mitchell, C. H. & Khurana, T. S. (2010). Superior calcium homeostasis of extraocular muscles. *Experimental Eye Research*, 91(5), 613-622.

Zhang, Y., Lin, S., Karakatsani, A., Rüegg, M. A. & Kröger, S. (2015). Differential regulation of AChR clustering in the polar and equatorial region of murine muscle spindles. *European Journal of Neuroscience*, 41(1), 69-78.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: DIE STRUKTUR VON MUSKELSPINDELN. (MODIFIZIERT NACH MAIER, 1997 (MAIER, 1997))	12
ABBILDUNG 2: CONFOKALE AUFNAHME EINER MUSKELSPINDEL AUS EINEM M. SOLEUS EINER C57BL/6-MAUS.	12
ABBILDUNG 3: REFLEXBOGEN DES MONOSYNTAPTISCHEN PATELLARSEHNENREFLEXES.	14
ABBILDUNG 4: DYSTROPHIN UND SEINE ISOFORMEN	16
ABBILDUNG 5: ZUSAMMENSETZUNG DES DGCs AM SARKOLEMM DER SKELETTMUSKULATUR UND IN DER NME.	19
ABBILDUNG 6: DAS GOWERS-ZEICHEN.	22
ABBILDUNG 7: MUSKELHISTOLOGIE UND IMMUNHISTOCHEMIE DER MUSKELDYSTROPHIE DUCHENNE IM MENSCHEN	24
ABBILDUNG 8: HISTOLOGIE DER SKELETTMUSKULATUR IN DER DMD^{MDX}-MAUS	28
ABBILDUNG 9: NEUROMUSKULÄRE ENDPLATTE IN DER DMD^{MDX}-MAUS	29
ABBILDUNG 10: DARSTELLUNG EINER MUSKELSPINDEL	38
ABBILDUNG 11: ÜBERSICHT DER FÄRBUNGEN FÜR DYSTROPHIN IN DER NME IM M. SOLEUS IN DER C57BL/6-, DER C57BL/10SNJ- UND DER DMD^{MDX}-MAUS	41
ABBILDUNG 12: ÜBERSICHT DER FÄRBUNGEN FÜR β-DYSTROGLYKAN IN DER NME IM M. SOLEUS IN DER C57BL/6-, DER C57BL/10SNJ- UND DER DMD^{MDX}-MAUS	42
ABBILDUNG 13: ÜBERSICHT DER FÄRBUNGEN FÜR UTROPHIN IN DER NME IM M. SOLEUS IN DER C57BL/6-, DER C57BL/10SNJ- UND DER DMD^{MDX}-MAUS.	43
ABBILDUNG 14: DYSTROPHIN IN DER MUSKELSPINDEL DER C57BL/6-MAUS	45
ABBILDUNG 15: DIE LOKALISATION VON DYSTROPHIN IN DER MUSKELSPINDEL DER C57BL/10SNJ-MAUS	46
ABBILDUNG 16: DIE LOKALISATION VON DYSTROPHIN IN DER MUSKELSPINDEL DER DMD^{MDX}-MAUS ..	47
ABBILDUNG 17: BETA-DYSTROGLYKAN IN DER MUSKELSPINDEL DER C57BL/6-MAUS	49
ABBILDUNG 18: BETA-DYSTROGLYKAN IN DER MUSKELSPINDEL DER C57BL/10SNJ-MAUS	50
ABBILDUNG 19: BETA-DYSTROGLYKAN IN DER MUSKELSPINDEL DER DMD^{MDX}-MAUS	51
ABBILDUNG 20: UTROPHIN IN DER MUSKELSPINDEL IN DER C57BL/6-MAUS	53
ABBILDUNG 21: UTROPHIN IN DER MUSKELSPINDEL DER C57BL/10SNJ-MAUS	54
ABBILDUNG 22: UTROPHIN IN DER MUSKELSPINDEL DER DMD^{MDX}-MAUS	55
ABBILDUNG 23: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER ANNULOSPIRALEN ENDIGUNG AN DER INTRAFUSALEN MUSKELFASER IM LÄNGSSCHNITT IN DER WILDTYP-MAUS.	56
ABBILDUNG 24: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER ANNULOSPIRALEN ENDIGUNG AN DER INTRAFUSALEN MUSKELFASER IM LÄNGSSCHNITT IN DER DMD^{MDX}-MAUS	56
ABBILDUNG 25: ANZAHL DER UMRUNDUNGEN PRO 50 μM DER ANNULOSPIRALEN ENDIGUNGEN.	57
ABBILDUNG 26: ANZAHL DER UMWINDUNGEN AM BEISPIEL DER C57BL/6-, DER C57BL/10SNJ- UND DER DMD^{MDX}-MAUS	58
ABBILDUNG 27: ANZAHL DER MUSKELSPINDELN IN DER C57BL/6-, DER C57BL/10SNJ- UND IN DER DMD^{MDX}-MAUS.	60
ABBILDUNG 28: DARSTELLUNG EINER ÜBERSICHTSAUFNAHME DES M. SOLEUS DER C57BL/6-MAUS.	60
ABBILDUNG 29: ANZAHL DER MUSKELSPINDELN IN DER C57BL/6-MAUS, DER C57BL/10SNJ-MAUS UND DER DMD^{MDX}-MAUS.	61
ABBILDUNG 30: LONGITUDINALE ANSICHT VON ZWEI INTRAFUSALFASERN IM M. SOLEUS DER WILDTYP-MAUS	67

8.2 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: LISTE DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN	31
TABELLE 2: LISTE DER ERSTANTIKÖRPER	31
TABELLE 3: LISTE DER ZWEITANTIKÖRPER	32
TABELLE 4: LISTE DER HILFSMITTEL	32
TABELLE 5: LISTE DER VERBRAUCHSMITTEL	33
TABELLE 6: ZUSAMMENSETZUNG DER NARKOSELÖSUNG.....	33
TABELLE 7: ZUSAMMENSETZUNG DES 20 % PARAFORMALDEHYD	33
TABELLE 8: ZUSAMMENSETZUNG DER PBS.....	33
TABELLE 9: ZUSAMMENSETZUNG DER BLOCKING SOLUTION.....	34
TABELLE 10: LISTE DER PRÄPARATIONSHILFEN	34
TABELLE 11: LISTE DER COMPUTERPROGRAMME.....	34